FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1965. N° 665

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Roland GAILLON

né le 7 janvier 1938 à Paris (16e)

Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE QUELQUES PROBLEMES POSES PAR L'EXAMEN DES SERUMS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS.

Président : M. Jean BERNARD, Professeur.

EDITIONS A.G.E.M.P. — 8, RUE DANTE · PARIS-Ve

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

15-12-1963

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Mouquin (M.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Gaston CORDIER.

1er ASSESSEUR . . . . . Daniel BARGETON
2e ASSESSEUR . . . . . Paul CASTAIGNE

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
— —	DOGNON (A.)
— —	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Gérontologie expérimentale	N...
Histoire de la médecine et de la chirurgie	JOANNON (P.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
— —	BRICAIRE (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	DEPARIS (M.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.) / POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Pharmacologie	LÉVY (Mlle J.)
Physiologie	DEJOURS (P.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.) / GOUGEROT (L.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIÉ (P.)
Cliniques chirurgicales — Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
Cliniques chirurgicales — Cochin	LEGER (L.)
Cliniques chirurgicales — Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
Cliniques chirurgicales — Pitié	CORDIER (G.)
Cliniques chirurgicales — Saint-Antoine	GOSSET (J.)
Cliniques chirurgicales — Salpêtrière	SICARD (A.)
Cliniques chirurgicales — Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales — Broussais	MILLIEZ (P.)
Cliniques médicales — Broussais	LENÈGRE (J.)
Cliniques médicales — Cochin	BROUET (G.)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
Cliniques médicales — Lariboisière	SÈZE (S. de)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	BOUDIN (G.)
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
— — (Cochin)	OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	N...
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale	DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Séméiologie traumatique et orthopédique	JUDET (R.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	N...

b) Professeurs à titre personnel :

Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
Médecine	BOUR (H.)
Médecine	LAMBLING (A.)
Médecine	LHERMITTE (F.)
Médecine	PEQUIGNOT (H.)
Médecine	PERRAULT (M.)
Médecine	SIGUIER (F.)
Médecine	WORMS (R.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAITRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.
Anatomie	CABROL (C.) COUINAUD (C.) GILLOT (C.) HUREAU (J.)
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch. ABELANET (R.) CHOMETTE (G.) GOUYGOU (Ch.), pr. s. ch. NEZELOFF (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)
Anesthésiologie	N. du BOUCHET (Mme) KERN (E.) VOURC'H (G.)
Bactériologie	BARBIER (P.) pr. s. ch. CHRISTOL (D.) DAGUET (G.) LE MINOR (L.) TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	BAULIEU Et. m. conf. BOURILLON (R.) CARTIER (P.) pr. s. ch. CORNILLOT (P.) DREYFUS (J.-Cl.) GONNARD (P.) JEROME (H.) KRUH (J.) LEGRAND (J.-Cl.) NORDMANN (J.)
Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	PLAS (F.)
Biologie médicale	BENHAMOU (J.-P.) BOIVIN (P.) HARTMANN (L.) pr. s. ch.
Carcinologie	BOIRON (M.) DENOIX (P.) MATHE (G.) SELIGMANN (M.)
Cardiologie	HATT (P.-Y.)
Dermato-Syphiligraphie	CIVATTE (J.) DUPERRAT (B.) HEWITT (J.) TOURAINE (R.)
Electro-Radiologie	HEITZ (F.) m. conf. LEDOUX-LEBARD (G.)
Embryologie	ROUX (Ch.)
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.) DUHAMEL (G.)
Histologie	COUJARD (R.), pr. s. ch. DA LAGE MAROIS (M.) RACADOT (J.) SCHRAMM (B.)

	MM.
Hydrologie	BESANÇON (F.) CORNET (A.)
Hygiène	BLANCHER (G.) CORRE-HURST (Mme L.) ROUSSEL (A.) SAPIN-JALOUSTRE (H.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.) LISSAC (J.) RAPIN (M.)
Maladies métaboliques	ANTOINE (B.) CROSNIER (J.) RICHET (G.) SEBAOUN (J.)
Médecine légale	BOURGUIGNON (A.) FOURNIER (E.) GUENIOT (M.) HADENGUE (A.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)
Neuro-Psychiatrie	CAMBIER (J.) CATHALA (H.) ESCOUROLLE (R.) GAUTIER (J.-Cl.) LAPRESLE (J.) LEREBOULLET (J.) PICHOT (P.) TARDIEU (G.)
Obstétrique	GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) LEVY (J.) LEWIN (D.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) SENEZE (J.) SUREAU (C.) TCHOBROUTSKY (Mme C.) THOYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	AUVERT (Mme B.) BRÉGEAT (P.) DUBOIS (A.) FONTAINE (Mme M.) SARAUX (H.)
Orthopédie	DUPARC (J.) MAURER (P.) MEARY (R.) POSTEL (M.) RAMADIER (J.)
Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.) PIALOUX (P.) SERGENT (H.)
Parasitologie	GOLVAN (Y.) HO THI SANG (Mlle) LAPIERRE (J.)

	MM.
Pathologie chirurgicale	BARCAT (J.) BINET (J.-P.) BLONDEAU (Ph.) CERBONNET (G.) CHATELIN (C.-L.) DAUTRY (P.) DEMIRLEAU DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GALEY (J.-J.) GARBAY (M.) GARNIER (H.) GAUDART-d'ALLAINES (Cl. de) GERMAIN (A.) LATASTE (J.) LOYGUE (J.) MAILLARD (J.-N.) MERCADIER (M.) NATALI (J.) PELLERIN (D.) PERROTIN (J.) PREMONT (M.) ROBERT (H.) THOMERET (G.) VAYSSE (J.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	BERTHAUX (P.) COTTENOT (Fr.) LŒPER (J.) Pr. s. ch. MAURICE (J.) MIKOL (Cl.) PAUPE (J.-R.)
Pathologie médicale	ACAR (J.) AUQUIER (L.) AUSSANNAIRE (M.) BEAUMONT (J.-L.) BERNIER (J.-J.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRISSAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CANIVET (J.) CARLOTTI (J.) CATINAT (J.) CHRÉTIEN (J.) CLOAREC (M.) COBLENTZ (B.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) DEBRAY (J.) ÉTIENNE (J.-P.) FREZAL (J.) FRITEL (D.) FUNCK-BRENTANO (J.-L.) GRIVAUX (M.) HAZARD (J.) HENNEQUET (A.) HIMBERT (J.) HOUSSET (E.) LAGRUE (G.) LESOBRE (R.) LEVEQUE (B.) MACREZ (C.) MOREAU (L.) NENNA (A.) NICK (J.) POULET (J.) ROYER (P.) TCHERDAKOFF (Ph.) THIBAULT (Ph.) TOURNEUR (R.) VILLIAUMEY (J.) WOLFROMM (R.)

	MM.
Pédiatrie-Puériculture	ALAGILLE (D.) ALISON (J.) CANLORBE (P.) GORIN (R.) LAFOURCADE (J.) LEPERCQ (G.) LESTRADET (H.) MALLET (R.) MANDE (R.) MINKOWSKY (A.) MOZZICONACCI (P.) POLONOVSKI (C.) REY (J.) RIBIERRE (M.) ROSSIER (A.) VIALATTE (J.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.) LECHAT (P.)
Physiologie	BARRES (G.) DURAND (J.) GIRARD (Fr.) m. conf. HUGELIN (A.) LAURENT (D.) SCHERRER (J.) pr. s. ch. VASSEUR (B.)
Physique médicale	CHANTEUR (J.) COURSAGET (J.) GREMY (F.) m. conf. MILHAUD (G.) PAGÈS (J.-Cl.) PELLERIN (P.) ROUCAYROL (J.-C.) pr. s. ch. TUBIANA (M.) m. conf.
Pneumo phtisiologie	DECROIX (G.) ISRAEL (L.) MEYER (A.) RENAULT (P.) SORS (Ch.)
Psychiatrie infantile	DENIKER (P.) DUCHE (D.) FLAVIGNY (H.)
Radiologie médicale	DUBOST (J.) LEFEBVRE (J.) MICHEL (J.-R.)
Rhumatologie	MASSIAS (P.)
Stomatologie	CAUHEPE (J.) CERNEA (P.) CHAPUT (Mme A.) m. c. agr. CREPY (Cl.) FLEURY (R.) GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) FOUET (P.) LABET (R.) MARCHE (J.)
Urologie	AUVERT (J.) MOULONGUET (A.) QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale	VERNE (J.-M.)
Clinique médicale	RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) MAYER (M.) MORIN (P.)
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie . . . . . HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.

Pathologie chirurgicale . . . . . RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. - CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté . . . . . M. LENA (J.)

Conseiller administratif . . . . . Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque . }
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine . . . . . } M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateurs . . . . . Mlles DUMAITRE (P.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Bibliothécaires . . . . . Mmes CONTET (J.), FORGET (F.),
Mlle LAURENT (H.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur JEAN BERNARD

qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse .

A Monsieur le Professeur Agrégé DAUSSET

qui m'a accueilli dans son service à l'hopital Saint-Louis , a permis la réalisation de ce travail et m'a orienté vers la Recherche Médicale .

A Messieurs les Docteurs COLOMBANI ET RIPAULT

qui m'ont guidé au cours de ce travail .

A Mesdames les techniciennes du laboratoire central de sérologie de l'hopital Saint-Louis

qui m'ont aidé dans la réalisation technique de cette thèse .

A mes Maîtres d'Externat :

Monsieur le Docteur Yves CACHIN

Chef de service à l'Institut Gustave-Roussy

Monsieur le Docteur Jean WEILL

Professeur au collège de Médecine

Monsieur le Docteur MOUSSOIR

Monsieur le Professeur Agrégé CANIVET

A ma femme

qui a soutenu mes efforts tout au cours de mes études

A mes enfants Claire et Xavier

A toute ma famille

et spécialement à mes grands-parents, Monsieur et Madame LERI, qui m'ont élevé et ont ainsi permis mon accès aux études supérieures .

A tous mes amis .

GENERALITES

En 1905, SCHAUDINN et HOFFMANN isolent l'agent pathogène de la syphilis ; la syphilis entre dans sa période biologique.

En 1901, BORDET et GENGOU décrivent une méthode permettant de déceler des anticorps : test de déviation du complément.

En 1906, WASSERMANN, NEISSER et BRUCK, utilisant comme antigène un extrait aqueux de foie de nouveau-né atteint de syphilis congénitale, appliquent la réaction de BORDET-GENGOU à la syphilis. La sérologie de la syphilis est née.

LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

Elle comprend deux temps successifs : le temps de fixation du complément, où l'on met en présence l'antigène, l'anticorps et le complément ; dans le deuxième temps, on ajoute le système hémolytique constitué par des hématies sensibilisées par des anticorps dirigées contre elles, destiné à visualiser l'éventuelle fixation du complément dans le premier temps. Si le complément est fixé dans le premier temps, il n'est plus disponible pour le deuxième et l'hémolyse ne se produit pas. Si il n'y a pas d'anticorps dans le sérum examiné, le complément n'est pas fixé et il permet l'hémolyse.

La technique originale de WASSERMANN met en présence une quantité fixe de sérum du malade et de complément et 3 dilutions différentes d'antigène. Le temps de fixation est de 1 heure à 37°C. L'hémolyse se fait en 1 heure à l'étuve à 37°C.

Deux temps, 5 réactifs, tel est le schéma de base à partir duquel bien des variantes sont possibles.

Nous détaillons au chapitre "Techniques" la méthode de KOLMER, la plus utilisée actuellement, quicest la seule réaction d'hémolyse que nous pratiquons au Laboratoire Central de Sérologie de l'Hôpital Saint-Louis.

Ses caractéristiques principales sont :

- un titrage direct du complément
- une fixation du complément à + 4°C pendant 18 heures
- l'utilisation de deux unités de complément
- une hémolyse à 37°C pendant 1/4 d'heure
- l'utilisation d'une hémolysine forte.

Le problème de la spécificité des antigènes utilisés dans la réaction de fixation du complément s'est posé dès l'origine

Nous avons vu qu'en 1906, WASSERMANN utilisait un extrait de foie de nouveau-né mort de syphilis congénitale.

Dès 1907, PIERRE MARIE, FOIX, LEVADITI et ARMAND DELILLE, utilisèrent des "antigènes" lipoïdiques tissulaires provenant d'animaux indemnes de toute syphilis. On parle alors de "pseudo-antigène" et le terme d'anticorps est remplacé par celui de "réagine", qui a le mérite de ne pas avoir de définition.

Au lieu de parler d'un complexe antigène-anticorps, on pense à des microfloculations, fixant le complément, mais invisibles. Dès lors, pourquoi ne pas augmenter la taille des floculations de manière à les rendre perceptibles, à l'oeil nu ou au microscope ?

LES REACTIONS DE FLOCULATION

MEINICKE et SACHS-GEORGI mettent au point de 1917 à 1921, la réaction de floculation. A la même époque (1918-1921), VERNES décrit une autre technique de floculation. Les méthodes vont alors de succéder, variant surtout par la préparation du support de l'antigène : or colloïdal, baume de Tollu, cholestérol, mastic, etc...

De toutes ces réactions, il reste environ 4 tests utilisés dans la plupart des laboratoires : la réaction de KLINE, dont nous détaillerons plus loin la technique, la réaction du VENERAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (V.D.R.L.) décrite en 1946, qui peut être faite sur lame ou en tubes, la réaction de REIN-BOSSACK, qui est une variante de la réaction de KLINE et la réaction de KAHN, décrite en 1928, qui se fait en micro-tubes à fond rond et utilise un antigène concentré cholestériné.

SPECIFICITE DES ANTIGENES

Nous avons parlé de l'évolution des antigènes au cours de l'histoire de la sérologie de la syphilis.

La spécificité semblait excellente en 1906, lorsque WASSERMANN utilisait comme antigène, une solution préparée à partir d'un tissu infecté.

Mais lorsqu'en 1907, PIERRE MARIE, FOIX, LEVADITI et ARMAND

DELILLE utilisent des extraits de tissus indemnes, la spécificité semble beaucoup moins assurée.

En 1929, GAETHGENS prépare un extrait phénolé à partir des tréponèmes de souche REITER. Cette souche n'est pas pathogène, elle est cultivable, elle présente en commun avec le tréponème de souche NICHOLS au moins un antigène. Retour spectaculaire vers la spécificité des réactions d'hémolyse (cet extrait tréponémique de REITER n'est pas appliqué aux réactions de floculation).

Nous verrons qu'en fait, la spécificité de ce nouvel antigène n'est pas absolue.

En 1948, NELSON et MAYER mettent en évidence l'immobilisation des tréponèmes par les sérums de syphilitiques.

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

C'est une étape essentielle dans la spécificité des réactions sérologiques. Nous verrons qu'il assure pratiquement à coup sûr, le diagnostic des tréponématoses lorsqu'il est positif. On peut isoler l'anticorps immobilisant ou "immobilisine de la réagine, soit par absorption (NELSON), soit par ultracentrifugation (LEVADITI).

L'IMMUNO-FLUORESCENCE

Elle fut décrite par COONS A.H., CREECH H.J., JOES R.N. et BELINER E. en 1942 pour mettre en évidence des anticorps dirigés contre les pneumocoques.

En 1957, DEACONS W.E., FALCON V.H. et HARRIS A. l'appliquent

pour la première fois au diagnostic de la syphilis.

Là encore, théoriquement, la spécificité semble parfaite puisqu'il s'agit de l'agent pathogène qui est rendu fluorescent après contact avec l'anticorps correspondant.

En fait, on s'aperçut vite que certains sérums de sujets non-syphilitiques, utilisés à de faibles dilutions, rendaient les tréponèmes fluorescents. Le problème de la spécificité absolue de la réaction n'est pas résolu puisque le fait de diluer le sérum fait perdre de la sensibilité au test. Nous verrons ce que l'on peut penser actuellement des recherches en cours sur l'immuno-fluorescence après absorption sur tréponèmes de REITER.

Spécificité, sensibilité, tels sont les deux objectifs de la sérologie de la syphilis. On s'oriente de plus vers une quantification aussi précise que possible des réactions et vers une simplification des techniques de manière à les rendre plus reproductibles d'un laboratoire à l'autre.

PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES

TECHNIQUE DES REACTIONS DE KOLMER

-:-:-:-:-:-

I - MATERIEL

1) PREPARATION DE LA SUSPENSION D'HEMATIES SENSIBILISEES

On emploie du sang de mouton défibriné (prélevé stérilement sur une solution de :

- acide citrique : 1,37 g
- soude : 0,52 g
- glucose : 2,50 g
- eau distillée : qsp 75 ml

Ce sang peut être conservé à + 4°C pendant un maximum de 6 jours. On le lave 3 fois en soluté physiologique, en centrifugeant entre chaque lavage à 3.000 tours/minute. Le surnageant du dernier lavage doit être parfaitement incolore.

La suspension finale doit être à environ 2 %. Pour l'obtenir, on mélange 35 ml de culot globulaire lavé à 1.500 ml de soluté physiologique. Après mélange, la suspension est examinée au photomètre de VERNES en utilisant une cellule A, filtré 3-4. La densité optique doit être de 135° ± 5.

La suspension d'hématies est sensibilisée par mélange à parties égales avec le sérum hémolytique anti-hématies de mouton de l'Institut Pasteur, dilué au 1/1000. Elle est incubée au bain-marie pendant une heure à 37°C.

2) LES ANTIGENES

A/ L'antigène tréponémique de Reiter

Il s'agit d'un extrait protéique (plus ou moins purifié selon le laboratoire qui le fabrique) d'un ultrasonat de tréponèmes de REITER.

La dilution d'emploi est vériable et déterminée après titrage. Il se conserve à + 4°C.

B/ L'antigène cardiolipidique

Il est constitué par une solution alcoolique de :

- cardiolipide 0,02 %
- lécithine d'oeuf 0,1 %
- cholestérol 0,4 %

On le dilue au 1/200.

3) LA SOLUTION DE LEWIN-MAYER

Toutes les dilutions (sérums, complément, antigène) sont faites avec la solution de LEWIN-MAYER : ce tampon est stocké sous forme de solution-mère, qui est diluée au 1/5ème au moment de l'emploi.

La solution-mère est préparée de la manière suivante :

- dans 1000 ml d'eau distillée, on dissout :

- chlorure de sodium 83,8 g
- carbonate de sodium 2,52 g

- diethyl-barbiturate de sodium 3 g
(véronal sodique)

- dans 500 ml d'eau distillée, maintenue à l'ébullition, on met en solution :

- acide diéthyl-barbiturique 4,60 g
(véronal)
- chlorure de magnésium 1 g
- chlorure de calcium 0,20 g

Après refroidissement, on ajoute la deuxième solution à la première et on complète à 2 litres. Cette solution-mère doit être conservée à + 4°C.

4) LE COMPLEMENT

Nous utilisons du complément de cobaye, frais ou lyophilisé. Il est conservé à + 4°C jusqu'à son utilisation.

5) LES SERUMS

Ils doivent être limpides. On les sépare du caillot sanguin par centrifugation. Ils sont chauffés pendant 30 minutes dans un bain-marie à 56°C pour détruire le complément qu'ils renferment.

II - TECHNIQUE

1) TITRAGE DU COMPLEMENT

Il est exécuté avant chaque réaction de fixation. On le fait pour chacun des antigènes utilisés.

On prend le complément à une dilution fixe (1/10) et on en utilise des quantités croissantes en gardant le même volume réactionnel (0,80 ml) contenant 0,10 ml d'antigène.

On laisse en contact l'antigène et le complément pendant une heure

au bain-marie à 37°C. On note alors le tube qui donne l'hémolyse totale et on dit qu'il contient une unité de complément.

On calcule alors la dilution du complément qui contient 2 unités de complément sous un volume de 0,40 ml.

La concentration du complément (x) est égale à :

$$\frac{\text{2 volumes trouvés}}{0,04}$$

2) PREPARATION DE LA REACTION

On prépare "l'antigène activé" en mélangeant à parties égales la solution antigénique et la dilution convenable de complément.

"Le liquide de dilution" est préparé en ajoutant à un volume de tampon de LEVIN-MAYER, 4 volumes de complément dilué.

3) REPARTITION DANS LES TUBES

On met 0,05 ml de sérum dans 2 tubes à hémolyse dont l'un sera le tube de réaction et l'autre le témoin sérum.

On ajoute :

- dans le tube de réaction : 0,50 ml de l'antigène activé (cardiolipide ou REITER)
- dans le tube témoin : 0,50 ml de liquide de dilution activé.

On laisse pendant 18 heures à + 4°, puis les portoirs sont réchauffés au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.

On ajoute alors la suspension d'hématies de mouton sensibilisées à raison de 0,20 ml par tube.

L'hémolyse se fait au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes, jusqu'à lyse complète des témoins, puis 15 minutes à la température du laboratoire, avant la lecture.

Tous les réactifs sont répartis à l'aide de seringues automatiques.

4) TEMOINS DE LA REACTION

Outre le témoin pour chaque sérum, on met à tous les tests :

- un témoin globules rouges avec du complément et un témoin globules rouges sensibilisés sans complément.
- un témoin pour chaque antigène, constitué par :
  - 0,05 ml de liquide de dilution
  - 0,10 ml d'antigène dilué
  - 0,40 ml de dilution de complément
- un témoin positif qui peut être un sérum ou un mélange de sérums positifs connus. On fait des dilutions géométriques de raison 2 de ce sérum et on les utilise comme des sérums à tester.
- un témoin sérum négatif.

III - LECTURE

Le témoin antigène doit présenter une hémolyse complète.

Le témoin globules rouges ne doit pas être hémolysé.

Le témoin positif doit avoir un titre de même ordre de grandeur d'un jour à l'autre.

Pour chaque sérum testé, le témoin sérum doit présenter une hémolyse complète. Une hémolyse absente ou incomplète traduit un pouvoir anticomplémentaire du sérum et rend impossible l'interprétation des tubes réaction.

Le degré d'hémolyse ou d'absence d'hémolyse est apprécié selon l'échelle suivante :

- hémolyse totale	(100 %) = -
- hémolyse presque totale	(environ 90 à 95 %) = ±
-hémolyse nette	(environ 60 %) = +
- hémolyse faible	(environ 30 %) = ++
- hémolyse nulle	(0 %) = +++

IV - REACTIONS QUANTITATIVES

Nous ne faisons pas en routine de réaction de fixation du complément quantitative. Dans le cadre de cette étude, nous avons pratiqué cette réaction en diluant les sérums avec du tampon de LEWIN-MAYER, suivant une progression géométrique de raison 2. Les sérums ont ainsi été étudiés purs, au 1/2, au 1/4, au 1/8, au 1/16, au 1/32 et au 1/64.

La dilution à laquelle nous nous référons est la dilution initiale, c'est-à-dire celle à laquelle le sérum est introduit dans la réaction.

Les tubes de dilution sont ensuite traités comme les sérums purs. Le titre est celui de la dilution la plus élevée donnant une hémolyse évaluée à une croix.

TECHNIQUE DE LA REACTION DE KLINE

-:-:-:-:-

I - LE MATERIEL

1) L'ANTIGENE

On utilise l'antigène cardiolipidique de l'Institut Pasteur, constitué par :

- une solution alcoolique de
  cardiolipide 0,2 %
  lécithine d'oeuf 1,5 %
- et une solution alcoolique de
  cholestérol à 1 %

Les deux solutions sont livrés dans des ampoules scellées et se conservent à + 4°.

On prépare séparément :

A/ La suspension de cholestérol

On met 0,85 ml d'eau distillée au fond d'un flacon de 20 ml

muni d'un bouchon émeri.

On prélève 0,9 ml de la solution alcoolique de cholestérol à 1 % et on laisse tomber goutte à goutte la solution de cholestérol dans l'eau distillée, tout en agitant énergiquement le flacon. La solution de cholestérol doit se mélanger instantanément à l'eau. Après l'addition du cholestérol, on poursuit l'agitation pendant 10 secondes.

B/ Addition de l'antigène et de l'eau physiologique

- On prélève 0,1 ml de la solution antigénique que l'on ajoute à la suspension de cholestérol.

- On bouche le flacon et on l'agite vigoureusement pendant une minute.

- On verse ensuite 2,45 ml d'eau physiologique dans le flacon, on le bouche et on l'agite à nouveau modérément pendant 30 secondes.

- On laisse alors le flacon pendant 10 minutes à la température du laboratoire.

La suspension antigénique est prête à l'emploi et peut être utilisée pendant 24 heures ; on la conserve à + 4°C. Le flacon doit être agité avant chaque prélèvement.

On utilise cette suspension à la dose de 1/60 ml environ, quantité que l'on mesure à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 12/10 de millimètre de diamètre et sans pointe, laissant écouler 60 gouttes environ par ml de suspension.

2) LE SOLUTE PHYSIOLOGIQUE

Il est préparé chaque jour en dissolvant 8,5 g de chlorure de sodium dans un litre d'eau distillée.

3) LES SERUMS

Ils doivent être limpides. Ils sont préparés par centrifugation du sang total. On les chauffe au bain-marie à 56°C pendant une heure pour détruire leur complément.

II - LA REACTION

Dans chaque cellule de la plaque de verre, on met :

- 0,05 ml de sérum
- 1/60 ml de la suspension antigénique

Chaque plaque, une fois ses cellules remplies, est disposée sur un agitateur mécanique approprié qui lui imprime un mouvement circulaire. On laisse l'agitation se poursuivre pendant 4 minutes à la cadence de 120 tours par minute.

Témoins

Un témoin de l'antigène est toujours pratiqué, dans lequel le sérum est remplacé par de l'eau physiologique.

On pratique aussi le test sur un sérum négatif et un sérum positif connus.

III - LA LECTURE

Elle doit être faite immédiatement après l'agitation.

Si les microcristaux de cholestérol sont répartis uniformément, la réaction est négative.

Si les microcristaux sont agglutinés en amas, la réaction est positive. On note les résultats +, ++, +++ ou ++++, selon l'intensité de la réaction.

Le témoin en eau physiologique ne doit pas être agglutiné.

Une faible agglutination de quelques microcristaux est considérée comme douteuse dans le laboratoire central de sérologie de l'hôpital Saint-Louis.

IV - REACTION QUANTITATIVE

Elle est pratiquée systématiquement pour tous les sérums positifs.

On prépare une série de dilutions géométriques de raison 2 du sérum au moyen de soluté physiologique. (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64). Le sérum est décomplémenté avant sa dilution par chauffage au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes.

La réaction de KLINE est alors pratiquée suivant la même technique sur chacune des dilutions.

Le titre est donné par la dilution la plus élevée donnant une réaction positive d'intensité au moins égale à 2 croix.

TECHNIQUE DU TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

-:-:-:-:-:-

I - REACTIFS

1) LES TREPONEMES

On utilise des tréponèmes pâles pathogènes adaptés au lapin. Plusieurs souches sont utilisées. Dans ce laboratoire, nous employons la souche NICHOLS.

La souche NICHOLS doit être entretenue in vivo par inoculation intra-testiculaire à des lapins. Cette innoculation massive détermine chez le lapin une orchite, se manifestant entre le 6ème et le 10ème jour, par une pullulation intense de tréponèmes. On observe chez le lapin une orchite qui se traduit par une induration testiculaire et un épaississement de la vaginale.

Tous les lapins ne réagissent pas de la même façon à l' inoculation de tréponèmes. La richesse en germes est très variable d'un lapin à l'autre. Il n'est pas possible de prélever les testicules du lapin après le 12ème jour, car on peut voir apparaître alors des anticorps anti-tréponémiques du lapin fixés sur ces tréponèmes.

Ces anticorps risqueraient d'interférer avec la réaction, en pro-

voquant l'immobilisation spontanée des tréponèmes en présence de complément.

De toute façon, un tube témoin est utilisé, pour se mettre à l'abri d'une telle cause d'erreur.

2) LE MILIEU DE SURVIE

Le milieu de NELSON-MAYER est constitué par :

	Concentration en g pour 1.000 ml
- albumine de boeuf	25,00
- tampon phosphates : phosphate disodique cristallisé	1,816
- tampon phosphates : phosphate monopotassique	1,000
- pyruvate de sodium	0,500
- glutathion	0,385
- chlorhydrate de cysteine	0,200
- bicarbonate de sodium	0,656
- ultrafiltrat de sérum de boeuf	60 ml
- chlorure de soium à 0,85 %	qsp 1000 ml

Le pH est ramené à la neutralité au moyen de soude décinormale. L'atmosphère est constituée d'un mélange d'azote (95 %) et de gaz carbonique (5 %), strictement sans oxygène.

Au milieu de NELSON-MAYER, nous ajoutons de la streptomycine à la concentration de 1 g par litre et 3 ampoules de pénicillinase pour 50 ml

3) LE COMPLEMENT

On fait un pool de sérums frais de cobaye, limpide, non hémolysé, filtré. Ce pool est conservé à - 20°.

Le complément lyophilisé n'est pas utilisable.

4) LES SERUMS

Ils doivent être absolument exempts de toute impureté (caoutchouc, cuivre, détergents, antibiotiques) et prélevés stérilement.

Ils sont conservés à - 20°C jusqu'à utilisation, puis inactivés à 56°C pendant 30 minutes.

II - TECHNIQUE

1) PREPARATION DE LA SUSPENSION DE TREPONEMES PÂLES

Le lapin est sacrifié vers le 2ème ou le 3ème jour de son orchite, soit en moyenne, le 8ème jour suivant son inoculation. Les pédicules scrotaux sont serrés chacun par une pince et sectionnés en arrière de celle-ci. Le technicien est ganté et opère à l'abri des courants d'air, près d'un bec BUNSEN, pour éviter les contaminations. Tout le matériel doit être stérile. Les enveloppes sont incisées une à une au bistouri. Le testicule est saisi à la pince et détaché d'un coup de ciseaux.

Il est ensuite débité en tranches d'une épaisseur de 1 mm environ, reliées par une mince membrane non sectionnée. Les tranches sont incisées, puis rincées avec quelques ml de soluté physiologique stérile à 4°C et précipitées dans une fiole à extraction permettant l'introduction de l'atmosphère azote-gaz carbonique, après chaque ouverture.

On place alors dans la fiole une partie du milieu de survie et on laisse environ 5 minutes à l'étuve à 35°C. On contrôle la richesse en prélevant avec une anse en fil de platine un échantillon qui est examiné entre lame et lamelle à l'ultra-microscope.

Il faut obtenir une concentration d'environ 10 tréponèmes par champ (objectif 40 X, oculaire 12,5) ; on procède à une nouvelle extraction ou on ajoute du milieu conservateur suivant la richesse de la suspension, pour obtenir la concentration convenable ; puis on centrifuge la suspension 10 minutes à 1800 tours/minute et on décante dans un petit ERLENMEYER. Cet antigène doit être utilisé immédiatement.

2) DISTRIBUTION DES SERUMS ET DES REACTIFS

Chaque test comporte de 50 à 60 sérums examinés. On distribue 0,05 ml de chaque sérum dans 2 tubes ; le premier recevra 0,15 ml de complément chauffé à 56°C ("complément inactivé") et servira de témoin pour déceler une toxicité éventuelle du sérum vis-à-vis des tréponèmes; l'autre tube recevra 0,15 ml de complément frais et sera le tube de réaction. On répartit 0,35 ml de suspension tréponémique dans chacun des tubes. On peut remarquer que la dilution finale du sérum dans la réaction est de 1/11.

Chaque test comporte comme témoins généraux :

- un tube contenant 0,35 ml de suspension pure,
- un tube contenant 0,05 de soluté physiologique + 0,35 ml de suspension de tréponèmes,
- un tube contenant 0,05 ml d'ultra-filtrat de boeuf ayant servi à la confection du milieu + 0,15 ml de complément actif.

Comme témoins positifs, on utilise 6 dilutions d'un pool de sérums positifs connus : 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 (en dilution initiale du sérum introduit dans la réaction). On cherche à obtenir une immobilisation spécifique de 50 % dans le tube correspondant à une dilution moyenne.

3) INCUBATION

L'ensemble des tubes, mis sous atmosphère azote-gaz carbonique est placé à l'étuve à 35°C pendant 22 heures environ.

4) LECTURE DU TEST

Dans chaque tube, après légère agitation on prélève une goutte de suspension et on l'examine entre lame et lamelle au microscope à fond noir. On compte 25 tréponèmes (mobiles ou immobiles) et on note le nombre de tréponèmes mobiles. On a ainsi le pourcentage de mobilité en multipliant par 4 le résultat obtenu.

Les témoins négatifs doivent donner de 90 à 100 % de mobilité. Au-dessous de 80 % pour les témoins généraux, le test n'est pas lisible. Pour chaque sérum, on ne rend pas de résultat si le pourcentage d'immobilisation dans le tube témoin est supérieur à 20 % (sérum dit "toxique").

Le pourcentage d'immobilisation spécifique (IS %) est exprimé par la formule :

$$IS\ \% = \frac{(\%\ \text{mobiles témoin} - \%\ \text{mobiles réaction}) \times 100}{\%\ \text{mobiles témoins}}$$

5) RECHERCHE DU COMPLEMENT RESIDUEL

Il est pratiqué dans tous les tubes de réaction (à l'exclusion des tubes témoins de chaque sérum).

Le titrage du complément résiduel se fait par une technique d'hémolyse à 37°C pendant 30 minutes. Les réactifs utilisés sont des hématies de mouton, lavées, et du sérum de lapin anti-hématies de mouton.

Dans chaque tube témoin, on ajoute :

- 0,10 ml de suspension d'hématies sensibilisées

- 0,15 ml de tampon véronal au 1/5

Le test n'est valable que s'il reste du complément à la fin de la réaction (il est introduit en excès dans les tubes de tests).

6) EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Nous donnons avec chaque résultat une échelle :

- IS % 0 à 20 : négatif
- IS % 21 à 50 : douteux
- IS % 51 à 100 : positif

TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE SUR TREPONEMES PALES DE SOUCHE NICHOLS (TEST DE COONS INDIRECT)

-:-:-:-:-:-

I - LE MATERIEL

1) LA SUSPENSION DE TREPONEMES

Elle est obtenue en débitant en tranches minces des testicules de lapin syphilitiques au 8ème jour de l'orchite, suivant la technique décrite pour le test d'immobilisation des tréponèmes. Le broyat de testicules est agité en eau physiologique pendant 5 minutes environ, puis le liquide d'extraction est centrifugé à 1.800 G pendant 5 minutes pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant constituant la suspension d'antigène est additionné de streptomycine à la concentration de 1 g/l et ajusté de façon à montrer dans la préparation finale environ 50 tréponèmes par champ (grossissement 320).

La suspension est conservée à + 4°C jusqu'à l'emploi. Avant d'être utilisée en routine, chaque nouvelle suspension est testée vis-à-vis de sérums positifs et négatifs connus.

2) LE CONJUGUE FLUORESCENT

Immunisation des lapins : A 1 ml de la solution de gamma-globulines humaines à 16,5 %, du Centre National de Transfusion Sanguine, on ajoute 9 ml du tampon phosphaté de SORENSEN :

- phosphate disodique sec		6,81 g
- phosphate monopotassique sec		2,54 g
- eau distillée	qsp	1.000 ml

On ajoute progressivement un volume égal de solution à 2 % d'alun de potassium. Le pH est contrôlé constamment par l'adjonction préalable de quelques gouttes de solution alcoolique de bleu de bromothymol, la coloration vert-jade étant maintenue par addition de lessive de soude au 1/5. On ajoute 20.000 unités de pénicilline et 20 mg de streptomycine. Le mélange est conservé à 4°C et remis en suspensions avant chaque injection.

On injecte le lapin deux fois par semaine pendant 5 semaines. Les injections sont faites dans la veine marginale de l'oreille, à doses croissantes de 0,3 à 1 ml. Les animaux fournissant de bons anticorps, présentent toujours un choc assez sévère pendant les quelques minutes qui suivent l'injection. On a intérêt, si ce choc est trop brutal, à espacer un peu les premières injections.

Cette série est suivie d'un repos de 15 jours, puis de 3 nouvelles injections de rappel, puis d'un repos d'un mois, et enfin d'une dernière injection qui précèdera de 8 jours le premier titrage de contrôle.

Contrôle des anticorps avant conjugaison : On peut, soit pratiquer des immuno-électrophorèses, soit se contenter de ring-tests à des dilutions allant de 1/5000 à 1/160000 en tampon pH 7,2 avec des gammas-globulines humaines antigéniques. Les ring-tests se pratiquent de la ma-

nière classique en tubes capillaires. La positivité se traduit par l'apparition d'un disque de floculation à la limite de séparation des 2 réactifs.

Il faut que le titre atteigne au moins 1/40.000. Sinon, l'animal subit, un mois plus tard, d'autres injections. Certains animaux ne développent jamais des taux suffisants d'anticorps.

Un lapin bien immunisé peut être utilisé très longtemps, en le soumettant tous les mois à des injections de rappel de 1 ml.

Conjugaison du sérum de lapin anti-gamma globulines humaines : On précipite les gamma globulines par le sulfate disodique à 32 % en ajoutant goutte à goutte, à un volume initial de sérum de lapin, un volume égal de ce sel et en agitant constamment.

Après 30 minutes de repos à + 4°C, le précipité est obtenu par une centrifugation à 6.000 tours/minute pendant 10 minutes.

Le liquide surnageant doit être limpide ; il est décanté et le précipité est dissout dans le tampon pH 7,2 jusqu'au volume initial. On refait une précipitation par le sulfate de sodium suivant la même technique.

Le culot de centrifugation est redissout dans la solution tampon et ramené au volume initial de l'immun-sérum. On y ajoute une solution d'isothiocyanate de fluorescéine à raison de 1/10 du volume final. La solution d'isothiocyanate de fluorescéine est obtenue en dissolvant 50 mg de ce corps dans 5 ml d'une solution tampon pH 9 formée par :

- carbonate monosodique		3,36 g
- carbonate disodique		1,66 g
- eau bidistillée	qsp	100 ml

La fixation de l'isothiocyahate de fluorescéine est considérée comme terminée après 12 heures de séjour à + 4°C et le conjugué est prêt au titrage. Il est conservé non dilué à - 20°C.

Titrage du conjugué : Chaque fois qu'un nouveau lot de conjugué est utilisé, il est titré sur une série de sérums positifs et négatifs connus par rapport au conjugué précédemment utilisé.

On connait ainsi la dilution à laquelle il faut employer le nouveau conjugué pour obtenir des résultats identiques à ceux que l'on avait avec le matériel précédent.

3) LA SOLUTION TAMPON

La formule de cette solution est :

- chlorure de sodium		6,80 g
- phosphate disodique		1,48 g
- phosphate monopotassique		0,43 g
- eau distillée	qsp	1.000 ml

Le pH est de 7,2

La solution tampon est conservée à + 4°C.

4) LES SERUMS A TESTER

Ils doivent être limpides et non hémolysés.

Ils sont décomplémentés par un séjour de 30 minutes dans un bain-marie à 56°C.

On peut les conserver pendant plusieurs mois à - 20°C.

5) LE MATERIEL OPTIQUE

Nous utilisons un microscope ZEISS standard, équipé d'un conden-

sateur à fond noir et d'une double source lumineuse : lumière blanche et ultra-violette. Cette dernière est fournie par un brûleur à vapeur de mercure OSRAM HBO 200. Les filtres utilisés sont deux filtres d'excitation BG 12 et un filtre d'arrêt OG 5. Le système optique lui-même est composé d'un objectif à sec 40 X et d'un binoculaire 8 X. Le grossissement final est de 320.

Il est indispensable de faire la lecture en chambre noire.

II - LE TEST LUI-MEME

1) LES DILUTIONS DE SERUM

Les sérums sont d'abord dilués au 1/100 en ajoutant à 0,05 ml de sérum, 5 ml de solution tampon. Les dilutions suivantes se font selon une progression géométrique de raison 2, en ajoutant 5 gouttes de la dilution précédente, prélevées à la pipette DUCLAUX (soit 0,05 ml) à 5 gouttes de solution tampon.

Il faut remarquer à ce propos que, suivant ce mode de dilution, il y a le même écart entre un sérum positif au 1/100 et un sérum positif au 1/200 qu'entre deux sérums dont l'un serait positif au 1/3.200 et l'autre positif au 1/6.400.

2) LA PREPARATION DES LAMES

Les lames de verre utilisées mesurent 7,5 x 2,5 cm. On grave sur chaque lame son numéro dans le protocole et 3 cercles d'environ 1 cm de diamètre. Au centre de chacun de ces cercles, on étale une goutte de suspension de tréponèmes. Les lames sont alors séchées pendant une heure à l'étuve, puis fixées pendant 10 minutes dans un bain d'acétone pure.

3) SENSIBILISATION

On dépose chacune des 3 dilutions correspondant à chaque échan-

tillon de sérum à raison d'une goutte (0,05 ml) par plaque. Les dilutions utilisées sont 1/100, 1/200 et 1/400. Tous les sérums positifs au 1/400 sont repris dans le protocole suivant à des dilutions plus importantes (de 1/800 à 1/25.600).

On laisse ensuite les lames incuber pendant une heure dans une chambre humide, formée par un plateau émaillé dont le fond est tapissé d'une couche d'ouate de cellulose imbibée d'eau.

4) LAVAGE

Les lames sont ensuite lavées par un jet de solution tampon, puis immergées pendant 10 minutes dans un bain de solution tampon.

Elles sont ensuite essuyées soigneusement, sauf au niveau des cercles gravés ayant reçu les réactifs.

5) CONJUGAISON

On dépose une goutte (0,05 ml) de conjugué fluorescent sur chaque cercle gravé.

L'incubation se fait pendant une heure en chambre humide.

6) FIN DU TEST

Les lames sont de nouveau lavées, immergées pendant 10 minutes dans la solution tampon et essuyées.

Elles sont ensuite montées dans un mélange comportant 9 parties de solution tampon pour une partie de glycérine pure. On les recouvre d'une lamelle de 22 x 60.

III - LECTURE

On utilise l'échelle suivante :

- les tréponèmes ne sont pas visibles en lumière ultra-violette, mais leur présence est vérifiée en lumière blanche.

± les tréponèmes sont visibles en lumière ultra-violette, mais ils ne brillent pas.

+ à +++ les tréponèmes sont fluorescents. Le nombre de croix est apprécié selon le degré de fluorescence.

IV - TEMOINS

Chaque protocole comporte un témoin positif de référence, étudié en dilution géométrique de raison 2, de 1/100 à 1/25.600. On obtient ainsi tous les degrés de positivité entre le négatif et le +++. Ce témoin permet de juger de la sensibilité du test du jour et de la répétabilité du test.

V - INTERPRETATION DU TEST

Pour juger de la valeur de la première dilution employée dans le test (1/100), il suffit de constater qu'aucun des sérums négatifs étudiés jusqu'à ce jour en test d'immuno-fluorescence et en test d'immobilisation des tréponèmes, n'a été trouvé positif au 1/100 en immuno-fluorescence. Ces résultats ne sont valables bien entendu qu'avec notre matériel optique et notre conjugué fluorescent.

Nous déclarons donc positif tout sérum qui donne une fluorescence nette au 1/100.

VALEUR DIAGNOSTIQUE DES REACTIONS UTILISANT L'ANTIGENE CARDIOLIPIDIQUE

LE PROBLEME DE LA SPECIFICITE DE LA SEROLOGIE CARDIOLIPIDIQUE

-:-:-:-:-:-

Dès les premiers travaux de WASSERMANN, on s'aperçut que la spécificité des réactions sérologiques n'était pas absolue.

En 1948, DEMANCHE (26) donnait un tableau des fausses réactions positives de la syphilis. Bien que la situation ait évolué depuis, les grandes lignes de classifications sont encore valables. Il distinguait :

1) REACTIONS SYPHILOÏDES

Pian

Caraté

Spirochétoses

- fièvre récurrente
- fièvre des tiques
- sodoku
- ulcère phagenedis
- leptospirose ictéro-hémorragique

Leishmanioses

- kala-azar
- leishmaniose brésilienne

bouton d'Orient

clou de Biskra

Trypanosomiases

maladie du sommeil

mal de Calderas

Surra

2) FAUSSES REACTIONS BIOLOGIQUES

A/ Maladies chroniques ou cachectisantes

Lèpre

Lèpre tuberculeuse

Cancer

Tuberculose

B/ Maladies aigües fébriles

Paludisme

Rhumatisme articulaire aigü

Septicémies

Pneumonie franche

Pneumonie à virus

Naso-pharyngite

Angine de Vincent

Scarlatine

Vaccination antivariolique

Varicelle

Mononucléose infectieuse

Erythème polymorphe

C/ Intoxications

Saturnisme

Alcoolisme aigü

Narcose chloroformique prolongée

Intoxications par l'acide acétique

D/ Altérations de la crase sanguine et affections déglobulisantes

Hémoglobinurie nocturne paroxystique
Ictère hémolytique acquis
Anémies graves
Leucémies
Hypercholestérolémie
Prélèvements répétés chez un donneur de sang
Sérums agoniques et cadavériques

E/ Les maladies vénériennes et cutanées

Maladie de Nicolas-Favre
Chancre mou
Herpès, surtout génital
Tuberculoses cutanées
Psoriasis
Pityriasis rosé

F/ Des interventions thérapeutiques

Injections de vaccins
Sérothérapie intensive
Auto-hémothérapie
Pyréthothérapie
Médications de choc
Injections de Novarsénobenzol
Sulfamidothérapie

G/ Des états physiologiques

Grossesse
Allaitement

H/ Chez des individus normaux

et tout spécialement chez les sujets de race noire.

Certaines observations ont montré qu'il pouvait exister des réactions pseudo-syphilitiques dans les collagénoses et les dysprotéinémies.

Un résumé récent a été donné par DAGUET (20) :

"A Paris, les rares cas de fausses réactions que nous avons observé concernent : des lupus érythémateux disséminés, des leucoses, des maladies de Hodgkin, des hépatites, des myélomes, des néphroses lipoïdiques sévères, des cardiopathies."

PUTKONEN et LASSUS(80) signalaient récemment des réactions biologiques faussement positives chez plusieurs membres de 2 familles, alors que le test d'immobilisation des tréponèmes était négatif dans tous ces cas.

La spécificité des tests cardiolipidiques est donc souvent en défaut.

FIUMARA (33), revoyant les dossiers sérologiques de 1.000 malades, évalue à 20 % le pourcentage des réactions sérologiques faussement positives.

C'est dire la nécessité de ne tenir compte, pour affirmer une syphilis, que de plusieurs réactions dont les résultats concordent. C'est dire également la nécessité de contrôler les réactions discordantes par des tests plus spécifiques : immobilisation des tréponèmes ou immunofluorescence.

VALEUR DIAGNOSTIQUE DES REACTIONS UTILISANT COMME ANTIGENE LES TREPONEMES DE REITER !

G E N E R A L I T E S

-:-:-:-

L'origine du tréponème de REITER est difficile à définir avec certitude. Il semble qu'il s'agisse d'un tréponème saprophyte isolé à partir d'une lésion syphilitique où il coexistait avec Treponema Pallidum (1922).

En 1929, GAEHTGENS (35) utilise pour la première fois, comme antigène des réactions de fixation du complément, une suspension de tréponèmes de REITER.

En 1939, BECK démontre la spécificité de l'antigène de REITER.

En 1944, D'ALESSANDRO et ses collaborateurs, étudiant la structure antigénique du tréponème de REITER, montrent qu'il est constitué de 3 antigènes :

- l'antigène L lipidique, analogue au cardiolipide
- l'antigène TL protidique, commun à Treponema Pallidum
- l'antigène TS polysaccharidique.

Le tréponème de REITER est cultivable sur milieu synthétique, type milieu de BREWER, contenant de la caséine, un autolysat de levure,

du glucose, de la cystéine, de l'acide thioglycolique.

Les cultures sont repiquées tous les 4-5 jours et incubées à 37°C.

Pour l'utilisation comme antigène pour la fixation du complément, les cultures de tréponèmes de REITER sont séparées de leur milieu, puis ultrasonnées après alcalinisation.

Pour l'utilisation comme antigène pour l'immuno-fluorescence, les tréponèmes sont séparés de leur milieu de culture par centrifugation et lavés 3 fois en tampon pH 7,2.

II - LA FIXATION DU COMPLEMENT SUR ANTIGENE DE REITER

Nombreuses sont les publications qui ont comparé la réaction de fixation du complément, utilisant comme antigène le tréponème de REITER, aux autres tests sérologiques et en particulier au test d'immobilisation des tréponèmes.

MILLER J.N. et ses collaborateurs (58), étudient 639 sérums dans 4 laboratoires différents et comparent les résultats. Toute discordance entre les laboratoires entraîne un nouvel examen du sérum. Dans ces conditions, ils trouvent :

- 2 à 3 % de sérums anti-complémentaires,
- 3 à 5 % de sérums isolément positifs en fixation de complément sur antigène de REITER,
- 6 à 7 % de sérums négatifs en test de KOLMER sur antigènes de REITER et positifs en test d'immobilisation des tréponèmes,

soit une discordance totale d'environ 10 %. Mais il faut noter que le pour-

centage de négatifs dans les deux tests est d'environ 50 % ; ce qui augmente très sensiblement le nombre des concordances.

WILKINSON et JOHNSTON (91) étudiant 466 sérums posant des "problèmes sérologiques", trouvent une discordance de 11,8 % entre le test d'immobilisation des tréponèmes et le test de fixation du complément sur antigène de REITER suivant la technique de KOLMER. Lorsqu'ils étudient 133 sérums de syphilitiques certains, la discordance entre les deux tests est de 20 %.

KJELLANDER, SIEVERS et VOGELSAND (48), étudiant 1.257 sérums dans 2 laboratoires travaillant à l'aveugle, trouvent une discordance de 16,6 % entre les 2 tests. Mais il faut noter, là encore, le grand nombre de sérums négatifs étudiés ($\frac{385}{1257}$ = 31 % des cas).

DE BRUIJN (15), faisant une revue d'ensemble de la littérature, conclut que la spécificité du test d'immobilisation des tréponèmes est supérieure à celle du KOLMER-REITER, mais que ces deux tests ont la même sensibilité.

Travaux personnels

En reprenant l'étude de COLOMBANI et RIPAULT (18) sur 3.326 sérums, nous avons comparé le test de KOLMER sur antigène de REITER au test d'immobilisation des tréponèmes. Ces sérums ont été pris au hasard parmi ceux que reçoit le Laboratoire des Tests de Nelson de l'Hôpital Saint-Louis.

Nous avons trouvé une concordance de 75 % entre les deux tests. Parmi les 25 % de sérums discordants, nous observons :

1 % de positifs en test de KOLMER-REITER et négatifs en test de NELSON

dont les 3/4 environ, sont des syphilitiques connus.

24 % de sérums positifs en test de NELSON et négatifs en test de KOLMER-REITER.

D'après notre travail, le test de KOLMER utilisant l'antigène de REITER possède une très bonne spécificité, mais sa sensibilité est beaucoup plus faible que celle du test de NELSON.

III - L'IMMUNO-FLUORESCENCE UTILISANT COMME ANTIGENE LE TREPONEME DE REITER

KENT, COVERT et STEVENS et collaborateurs (47) ont préconisé l'utilisation du tréponème de REITER comme antigène pour la réaction d'immuno-fluorescence. En étudiant 51, puis 204 sérums, ils concluent à une spécificité et une sensibilité équivalente à celle de l'immuno-fluorescence pratiquée sur tréponèmes de souche NICHOLS.

Il faut cependant noter que, en étudiant 141 sérums provenant d'individus non syphilitiques, ils trouvent un sérum positif au 1/200 en immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER alors qu'aucun sérum n'est trouvé positif au-delà de 1/100 en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

BORY, ROBERT et LABARRE préconisent l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER pour des raisons pratiques (tréponèmes cultivables) mais ne donnent pas de statistique comparant ce test à d'autres techniques sérologiques.

Travaux personnels :

Nous avons étudié l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER, sur 50 sérums de banque du sang, dont la sérologie classique était négative, et provenant de sujets ne présentant aucun antécédent connu de syphilis (tableau I). Cette étude nous a permis de tester sur cet antigène

notre anti-globuline fluorescente. Nous voyons qu'avec notre matériel, l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER ne peut être considérée comme significative qu'à partir d'une dilution de 1/100.

Nous avons ensuite étudié 88 sérums en comparant les titres qu'ils donnaient en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS et sur tréponèmes de REITER. Ces 88 sérums provenaient de sujets syphilitiques (le test d'immobilisation des tréponèmes était positif) et ils présentaient tous une réaction de KOLMER sur antigène de REITER négative. Ce dernier test était fait aux dilutions de 1/1 à 1/16 de manière à éliminer tout phénomène de zone.

Les résultats sont donnés par les tableaux II et III

On peut noter que l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS donne des résultats positifs à des dilutions plus élevées que l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER.

De plus, cette dernière reste parfois négative alors que l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS est positive à une dilution égale ou supérieure à 1/400.

Nous avons étudié d'autre part 32 sérums d'individus n'ayant aucun antécédent connu de syphilis et négatifs tant en sérologie classique qu'en test d'immobilisation des tréponèmes, mais donnant une réponse franchement positive sur test de KOLMER pratiqué sur antigène de REITER.

La comparaison entre les deux immuno-fluorescences a montré que ces 32 sérums étaient négatifs sur tréponèmes de NICHOLS, alors que

- 19 étaient négatifs ou suspects au 1/100 sur tréponèmes de REITER.
- 13 étaient positifs au 1/100 et au delà sur tréponèmes de

REITER, sans que cette positivité dépasse la dilution de 1/400.

Nous pouvons donc conclure de notre étude que l'immuno-fluorescence pratiquée sur tréponèmes de REITER est loin de donner des résultats aussi satisfaisants que ceux de ce même test pratiqué sur tréponèmes de NICHOLS. Moins sensible que ce dernier test, elle ne permet pas de résoudre le problème des REITER isolément positif . L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER nous paraît donc une technique à abandonner.

En effet :

- la culture de tréponèmes de souche REITER pose des problèmes techniques aussi délicats que ceux posés par l'entretien d'une souche NICHOLS chez le lapin ;

- la technique du test n'est pas modifiée, mais l'interprétation des lames est beaucoup plus difficile dans le cas d'un test fait sur tréponèmes de REITER.

- les résultats sont beaucoup moins satisfaisants que ceux que l'on obtient en pratiquant l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

TABLEAU I

ETUDE DE 50 SERUMS NEGATIFS POUR DETERMINER LA DILUTION SIGNIFICATIVE EN IF-REITER

	IF NICHOLS			IF REITER		
	-	±	+	-	±	+
1/5	12	13	25	28	7	15
1/10	25	16	9	37	5	8
1/50	45	5	0	44	5	1
1/100	50	0	0	50	0	0

TABLEAU II

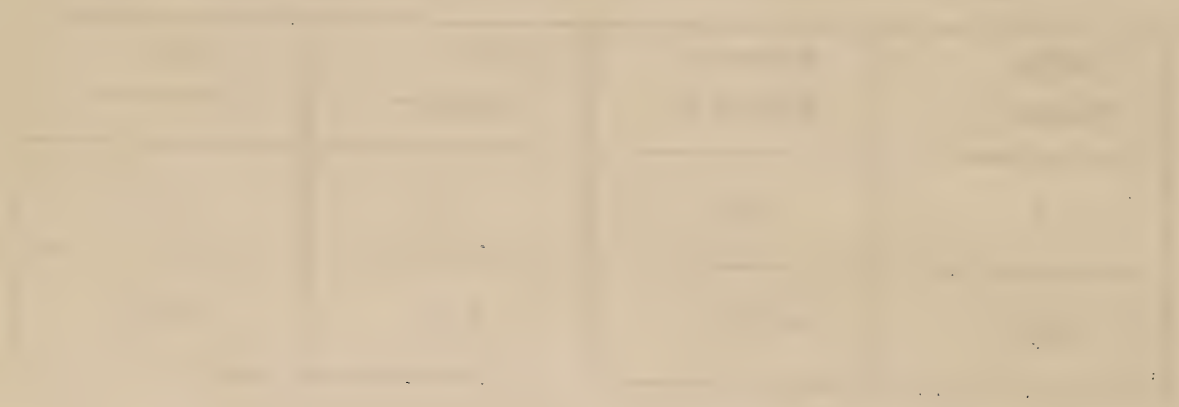
ETUDE COMPARATIVE QUANTITATIVE DE L'IF REITER ET DE L'IF NICHOLS SUR 88 SERUMS DE SYPHILITIQUES (CONFIRMES PAR LE TTT) ET PRESENTANT UN DEFAUT EN KOLMER-REITER

IF NICHOLS \ IF REITER	-	±	1/100	1/200	⩾ 1/400
-	0	0	0	0	0
±	1	3	0	0	0
1/100	5	4	3	0	0
1/200	10	7	3	8	0
⩾ 1/400	11	4	7	11	11

TABLEAU III

ETUDE COMPARATIVE DE L'IF-REITER ET L'IF-NICHOLS SUR 88 SERUMS DE SYPHILITIQUES PRESENTANT UN DEFAUT EN KOLMER-REITER

Reiter - Nichols -	Reiter - Nichols +	Reiter + Nichols -	Reiter + Nichols +
4	41	0	43
4,5 %	46,5 %	0 %	49 %



VALEUR DIAGNOSTIQUE DES REACTIONS UTILISANT COMME ANTIGENE LES TREPONEMES PALES DE SOUCHE NICHOLS .

G E N E R A L I T E S

-:-:-:-

Malgré de nombreux essais, le tréponème pâle pathogène n'a jamais pu être cultivé. Des souches de tréponèmes d'origine humaine ont été adaptées puis entretenues sur le lapin. Il en est ainsi de la souche NICHOLS, isolée en 1912 par la Major H.J. NICHOLS à partir du L.C.R. d'un malade faisant une rechute de syphilis nerveuse.

Nous avons vu, en étudiant la technique du test d'immobilisation des tréponèmes que T. Pallidum peut être entretenu sur milieu synthétique amérobie pendant quelques jours.

Par suite de l'impossibilité d'obtenir des cultures sur milieu synthétique, la composition antigénique de T. Pallidum est mal connue.

Deux tests principaux utilisent comme antigène le tréponème pâle de souche NICHOLS :

- l'immuno-fluorescence
- le test d'immobilisation des tréponèmes.

SPECIFICITE DU TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

-:-:-:-:-:-:-

Dès l'apparition du test de NELSON, de nombreux auteurs se sont attachés au problème de sa spécificité. Le test d'immobilisation des tréponèmes allait-il enfin lever les incertitudes de la sérologie de la syphilis ?

En 1951, DEMANCHE (27) écrivait :

"Chez les individus normaux, la réaction s'est toujours montrée négative. Il en a été de même chez les sujets indemnes de syphilis, mais atteints de maladies aigües fébriles ou allergiques chroniques, qui donnaient lieu à de fausses réactions avec les antigènes lipidiques, en premier lieu dans le paludisme et aussi dans la bronchite aigüe streptococcique, la méningite grippale, la menonucléose infectieuse, l'amygdalite aigüe, les oreillons, la rougeole, la cellulite, la diphtérie, la poliomyélite, les pneumonies atypiques, la coqueluche, l'eczéma et diverses dermatoses.

Dans l'espèce humaine, seuls le Pian et le Caraté ont donné avec la syphilis une réaction croisée et cela dans les 2 sens. Treponema Pallidum avec sérum pertenue et T. pertenue avec sérum syphilitique. En faisant des tests quantitatifs, les taux sont sensiblement les mêmes et ne permettent pas de distinguer les diverses tréponématoses.

Enfin, l'épreuve d'immobilisation a été négative dans tous les cas de réactions présumées faussement positives, c'est-à-dire chez tous les sujets dont le sérum avait donné par les méthodes classiques, des réactions que ni l'examen le plus complet, ni l'évolution ultérieure, ne permettent d'expliquer et que l'on qualifie de réactions biologiques."

C'est plus encore dans la pathologie tropicale que le test d'im-

mobilisation des tréponèmes allait se montrer précieux. On sait en effet la grande fréquence des sérologies cardiolipidiques positives en milieu tropical, à tel point que de nombreux médecins de ces pays avaient cessé de tenir compte des résultats que le laboratoire pouvait leur fournir en matière de sérologie de la syphilis.

En 1950, 75 lépreux étudiés par JOHANSEN F.A. et Soeur HILARY ROSS (17) en cardiolipide VDRL et KOLMER, ont montré

- 13 Négatifs
- 57 positifs à l'un des tests ou aux 2.

Parmi les 57 positifs à la cardiolipine, 12 seulement furent positifs au test d'immobilisation des tréponèmes, soit 16 %, ce qui est comparable aux études épidémiologiques antérieures sur ce genre de malades qui indiquaient que 15 à 20 % d'entre eux devaient être considérés comme ayant été atteints de syphilis.

Aucun test d'immobilisation des tréponèmes positifs ne fut observé chez des sujets non syphilitiques présentant transitoirement des tests de réagine faussement positifs sous l'influence de mononucléose infectieuse, pneumonie atypique, paludisme, rougeole, varicelle ou maladies infectieuses aigües variées.

A la même époque, DUREL, SAUSSE (31) et BOREL, GATE, SOHIER et THIVOLET (17), étudiant les paludéens, constatent que le test de NELSON se montre négatif lorsqu'il n'y a pas de syphilis associée.

Il en est de même pour les Filarioses, les Bilharzioses, les Spirochetoses autres que les Tréponématoses (fièvre récurrente, ulcère phagédénique, Sodoky) pour les Rickettsioses, les Viroses, les Trypanosomiases, les Leishmanioses cutanées ou viscérales.

Par contre, le test d'immobilisation des tréponèmes est positif dans toutes les tréponématoses : pian, bejel, carate (ou mal del Pinto). Il en est d'ailleurs de même de la sérologie classique. Il existe des antigènes communs entre ces tréponèmes et par conséquent des réactions sérologiques croisées.

Au terme de cette énumération, nous pouvons donc conclure à la spécificité parfaite du test de NELSON-MAYER, pourvu qu'on le considère comme un test de tréponématose et non comme un test de syphilis. C'est le test de référence de toute la sérologie. Nous admettrons donc comme syphilitique tout sérum présentant un test d'immobilisation spécifique positif. Les autres tests sérologiques seront donc tous confrontés au test de NELSON.

L'immobilisine est décelée plus tardivement que la réagine ou l'anti-protéine de groupe. Le test de Nelson-Mayer n'est jamais positif avant le 20ème jour suivant l'apparition du chancre. Par contre, au cours d'une syphilis traitée, l'immobilisine est l'anticorps qui persiste le plus longtemps. Il n'est pas rare de rencontrer un test de NELSON-MAYER positif chez un ancien syphilitique, alors que toutes les autres réactions sont négatives.

Il semble que la précocité d'institution du traitement influe beaucoup sur la négativation du test de NELSON : plus le traitement spécifique a été institué précocément, moins on a de chances de se trouver plus tard devant un test de NELSON-MAYER demeurant positif en dépit de toutes les tentatives thérapeutiques.

L'IMMUNO-FLUORESCENCE SUR TREPONEMES PALES DE SOUCHE NICHOLS

-:-:-:-:-:-

Depuis l'application à la syphilis du test de COONS indirect par DEACON (23) et l'introduction de ce test en France, par BOREL et DUREL (12), un grand nombre de travaux ont été faits pour apprécier sa valeur diagnostique. Citons les travaux de FRIBOURG-BLANC et NIEL (32) de BOREL L.J. DAGUET G.L. et FERNANDEZ D. (13), de VAISMAN et HAMELIN (89).

I - EVOLUTION DES ANTICORPS DECELES EN IMMUNO-FLUORESCENCE

1) AU COURS DE LA SYPHILIS PRIMAIRE

D'après COLOMBANI et RIPAULT (18) le test d'immuno-fluorescence est positif seul, à un stade très précoce de la syphilis : dès la première semaine du chancre.

NIEL et FRIBOURG-BLANC (69) ont pu suivre l'évolution des anticorps pendant toute la période d'incubation chez un sujet très suspect de contamination à une date précise et n'ayant aucun antécédent vénérien. Ils observent que l'immuno-fluorescence est positive au 1/300 le 17ème jour après le contage, alors que le chancre n'apparaît que le 23 ème jour (avec présence de tréponèmes démontrée à l'ultra-microscope). Dans la même publication, ils confirment l'apparition très précoce des anticorps décelés en immuno-fluorescence, en étudiant la syphilis expérimentale chez le cynocéphale. Chez cet animal, les anticorps apparaissent vers le 6ème jour. Chez les lapins, on peut les déceler vers le 7ème jour.

Le test d'immuno-fluorescence est donc très intéressant au stade primaire de la syphilis puisqu'il est le premier positif de tous les tests sérologiques.

2) AU COURS DES SYPHILIS SECONDAIRES

Tous les tests sérologiques sont positifs au cours des 2 premiers mois, avec ou sans traitement.

3) AU COURS DE L'EVOLUTION SOUS TRAITEMENT A LA PENICILLINE

Le test d'immuno-fluorescence peut rester positif plus ou moins longtemps.

4) AU COURS DE LA SYPHILIS TERTIAIRE

Le test d'immuno-fluorescence est positif dans la très grande majorité des cas (91,04 % dans la statistique de COLOMBANI et RIPAULT).

Les différences des résultats aux divers stades de la syphilis rendent difficiles toutes comparaisons globales entre le test d'immuno-fluorescence et le test d'immobilisation des tréponèmes. Le nombre de concordances sera toujours diminué par le nombre de sérums de syphilis primaire, négatifs au test de NELSON et positifs en test d'immuno-fluorescence. De même, les résultats différents obtenus par les différents auteurs peuvent s'expliquer partiellement par un choix différent des sérums.

Une étude comportant un grand nombre de sérums est celle de COLOMBANI et RIPAULT (18) qui étudièrent 3.156 sérums en comparant les résultats du test d'immuno-fluorescence à ceux du test de NELSON et de la sérologie cardiolipidique.

Ils observent une concordance entre l'immuno-fluorescence et le test de NELSON-MAYER dans 87,26 % des cas, entre l'immuno-fluorescence et la sérologie cardiolipidique dans 83,39 % des cas.

Résultats personnels

Nous avons étudié 466 sérums selon 3 techniques : le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS ; le test d'immobilisation des tréponèmes ; le test de fixation du complément sur antigène de REITER suivant la technique de KOLMER.

Les sérums et liquides céphalo-rachidiens ont été pris au hasard parmi ceux que reçoit le Laboratoire des Tests de NELSON de l'Hôpital Saint-Louis.

Les résultats globaux que nous avons obtenus, sont résumés sur le tableau IV. L'étude de la fixation du complément sur antigène de REITER sera étudiée dans ce chapitre.

Nous notons sur ce tableau que :

- 11 % des sérums sont négatifs dans les 2 tests,
- 79 % des sérums sont positifs dans les 2 tests,
- 3 % des sérums sont positifs en test de NELSON seul,
- 7 % des sérums sont positifs en immuno-fluorescence seule.

La concordance globale entre ces deux tests est donc de 90 %

Parmi ces 466 sérums, nous avions :

A/ 9 sérums provenant de nouveaux-nés, dont la mère était syphilitique. Parmi ces sérums :

- 1 était douteux en test de NELSON (21 à 50 %) et négatif en immuno-fluorescence ;
- 1 était douteux en test de NELSON (21 à 50 %) et positif au 1/400 en immuno-fluorescence ;

- Les 6 autres étaient positifs dans les 2 tests, le taux d'immuno-fluorescence variant de 1/100 à 1/800.

B/ 35 séruns provenant de sujets suspects de syphilis primaire, parmi lesquels :

- 4 étaient positifs dans les 2 tests
- 1 était négatif en immuno-fluorescence et douteux en NELSON
- 5 étaient douteux en NELSON et positifs en immuno-fluorescence
- 5 étaient négatifs en NELSON et positifs en immuno-fluorescence à des dilutions variant de 1/100 à 1/400.

C/ 21 séruns de syphilis secondaires qui se sont tous avérés positifs dans les 2 tests, l'immuno-fluorescence étant positive à des dilutions allant du 1/200 au 1/12.800.

D/ 77 séruns de syphilis anciennes traitées, parmi lesquels nous avons obtenu :

- 10 séruns (13 %) négatifs dans les 2 tests,
- 50 séruns (65 %) positifs dans les 2 tests,
- 6 séruns (8 %) négatifs en immuno-fluorescence et positifs en NELSON,
- 11 séruns (14 %) de discordances inverses.

Pour les autres séruns, les renseignements cliniques qui nous étaient fournis, ne nous ont pas permis de les ranger dans une catégorie précise.

En conclusion, nous pouvons dire que le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes pâles de souche NICHOLS a une grande valeur pour le diagnos-

tic de la syphilis. Il est spécialement utile au cours de la syphilis primaire, avant l'apparition des anticorps immobilisants. Etant facilement réalisé d'une manière quantitative, il permet de suivre d'une manière sûre, l'évolution d'une syphilis au cours de son traitement.

Le test d'immobilisation des tréponèmes pourrait alors être réservé à l'étude des sérums déjà négatifs en test d'immuno-fluorescence, ou à quelques cas particuliers. Jusqu'à présent, nous n'avons jamais observé au laboratoire des Tests de NELSON, de sérums provenant de sujets non syphilitiques, présentant une immuno-fluorescence positive à une dilution égale ou supérieure au 1/100. Cette dilution initiale n'est valable, bien entendu, que pour le matériel que nous utilisons.

TABLEAU IV

COMPARAISON DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE QUANTITATIVE PRATIQUEE SUR TREPONEMES DE SOUCHE NICHOLS ET DU TEST DE NELSON-MEYER

IF / TIT	-	±	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
0 à 20%	45	8	8	15	10	1	0	0	0	0
21 à 50%	6	3	13	6	10	2	2	0	0	0
51 à 96%	2	0	7	10	14	2	6	4	0	0
100 %	0	1	15	49	83	54	44	15	12	8

NOTE SUR QUELQUES TECHNIQUES NOUVELLES DE SEROLOGIE DE LA SYPHILIS

Il ne se passe guère de mois sans qu'un auteur propose une technique nouvelle pour l'étude de la syphilis. Certes nous n'en sommes plus au temps où dans chaque laboratoire, on préparait "son" antigène que l'on utilisait selon "sa" technique. Mais l'apparition, dans le cadre plus général de l'immunologie, de méthodes précises de recherche des anticorps fait apparaître de nouvelles possibilités pour la détection des syphilitiques.

Des recherches plus théoriques sur la cinétique des réactions, sur l'influence de divers composés plus ou moins définis, sur la structure fine des tréponèmes, ont permis d'imaginer des modifications techniques aux tests déjà classiques, ou de nouveaux tests sérologiques.

I - LE TEST QUANTITATIF D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

Il s'agit de l'étude par le test de NELSON de dilutions d'un même sérum.

Déjà en 1952, MOORE J.E. et MOHR C.F. (60) font état des expériences de NELSON sur le titre des immobilismes.

NIELSEN H.Aa. (70) étudie la reproductibilité du test de NELSON quantitatif en 1957.

En 1964, HEDERSTEDT B. et SKOG E. (40) étudient ce test quantitatif chez des malades atteints de syphilis récente.

En 1963, FRIBOURG-BLANC et NIEL (12) étudient également la reproductibilité du test de NELSON quantitatif.

Au laboratoire de sérologie de l'Hôpital Saint-Louis, nous avons trouvé une reproductibilité égale à 1 dilution en plus ou en moins au cours de l'étude de notre sérum témoin positif pendant 1 mois.

En fait, le test de NELSON quantitatif pose cependant des problèmes qui font hésiter la majorité des sérologistes français. La technique du test doit être plus parfaite encore que celle du test qualitatif. Le nombre de tubes examinés devient très important, ce qui alourdit encore un test déjà très compliqué.

Son développement ne pourra probablement se faire qu'après une limitation du nombre de tests d'immobilisation demandés. Il serait alors réservé à un petit nombre de sérums, posant des problèmes précis et que l'on désire étudier d'une manière approfondie.

II - LE TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES SENSIBILISE PAR LE LYSOZYME

De nombreuses études des tréponèmes en microscopie électronique ont semblé mettre en évidence une capsule autour de ces micro-organismes. Citons les travaux de SCHMEROLD et DEUBNER (84), en 1954, de SWAIN (85) en 1955, de KAWATA (44) en 1961, de MILLER et WILSON (59) en 1962, de GRIFFSTONE (38) en 1963, de PILLOT, DUPOUEY et RYTER en 1963 et 1964.

En 1961, METZGER, HARDY et NELL (57), pour augmenter la rapidité

du test de NELSON, proposent de mettre dans le milieu de survie du lysozyme de blanc d'oeuf. Ils pensent que le lysozyme pourrait avoir une action sur la capsule des tréponèmes et préparer ceux-ci à l'action des anticorps.

Ils montrent que les différences de sensibilité entre le test classique et le test d'immobilisation des tréponèmes avec lysozyme, sont faibles, mais que le temps d'incubation peut être diminué d'environ 60 %.

En 1962, FRIBOURG-BLANC (34) propose l'addition de lysozyme au test d'immobilisation des tréponèmes pour accroître la sensibilité.

En 1963, KENT et DE WEERD (46) obtiennent une augmentation de titre de 3 à 4 fois en ajoutant 0,0075 % de lysozyme cristallisé au milieu de survie.

Le test d'immobilisation des tréponèmes en présence de lysozyme est encore étudié par peu d'auteurs. Il pose actuellement 2 problèmes majeurs : sa spécificité est-elle aussi grande que celle du test de NELSON classique ? La sensibilité est-elle réellement augmentée, ou obtient-on seulement une réduction du temps d'incubation? La réponse à ces 2 questions ne pourra être donnée d'une manière irréfutable qu'après l'étude parallèle d'un très grand nombre de sérums étudiés simultanément selon les deux techniques.

III - LE PHENOMENE D'ADHERENCE - DISPARITION DES TREPONEMES

Il a été mis en évidence par NELSON en 1952.

Son principe est le suivant :

On met en contact une suspension de tréponèmes avec le sérum à examiner et du sang total hépariné de sujet sain. Si le sérum examiné provient d'un sujet syphilitique, les anticorps spécifiques se fixent sur les tréponèmes.

Le complexe ainsi formé capte du complément et adhère aux hématies. Les leucocytes phagocytent alors l'ensemble et les tréponèmes disparaissent de la suspension. Si au contraire, le sérum examiné provient d'un individu non syphilitique, les tréponèmes restent en suspension.

Ce test n'est pas utilisé en pratique car il est peu reproductible et sa réalisation est très délicate.

IV - LE TEST D'IMMUNO-DISPARITION DES TREPONEMES DANS LE PERITOINE DE COBAYE

En 1955, TANI T., MATSUBARA M. et HAYASHI T. (86) rapportent un phénomène d'immobilisation et de disparition des tréponèmes sensibilisés par un immun-sérum homologue, dans la cavité péritonéale de cobaye.

En 1959, puis en 1960, VAISMAN et HAMELIN (87-88) proposent ce test pour contrôler les tests de NELSON non satisfaisants.

Le principe du test est d'injecter un mélange d'une suspension de tréponèmes et du sérum examiné dans le péritoine d'un cobaye, puis d'examiner 4 et 7 heures après le liquide de ponction. Si le sérum provient d'un syphilitique, on ne retrouve plus de tréponèmes dans ce liquide. Si le sérum est négatif, on trouve le même nombre de tréponèmes après 4 ou 7 heures.

Si ce test est très intéressant du point de vue théorique, les difficultés pratiques pour sa réalisation sont telles, qu'il n'a jamais connu de développement important.

V - L'APPLICATION DE L'AUTO-ANALYSEUR A LA FIXATION DU COMPLEMENT

La première étude sur ce sujet est à notre connaissance, celle de VARGUES (92-93-94-95), exposée au Symposium International de Technicon en Octobre 1964.

On sait que l'auto-analyseur est maintenant utilisé d'une façon courante pour certains dosages chimiques : urée, glycémie, cholestérol, alcoolémie, par exemple.

Cet appareil comporte :

- une pompe proportionnate, permettant de prélever la quantité désirée de chacun des composants de la réaction ;
- un "sampler" ou échantillonneur, permettant de passer automatiquement d'un sérum à l'autre ;
- un système de bain-marie plus ou moins complexe ;
- un colorimètre et un enregistreur ; ces deux derniers étant reliés par un système électronique ne provoquant aucune inertie dans la transcription des résultats.

Dans son exposé, VARGUES étudie successivement :

- la cinétique de l'immuno-hémolyse ;
- la cinétique des réactions de fixation du complément ;
- le dosage automatique du complément, des hémolysines, des anticorps et des antigènes ;
- l'automatisation des réactions de fixation du complément.

Nous reprenons actuellement la dernière partie de cette étude : dosage automatique du complément et automatisation des tests en série de fixation du complément.

L'étude que nous pouvons présenter dans cette thèse n'est que très préliminaire, les modifications techniques à apporter à l'appareil, et au circuit étant encore actuellement en cours d'expérimentation. Mais

participant à la mise au point de cet appareil, nous avons voulu donner au cours de notre thèse les premiers résultats de notre travail et faire part des possibilités nouvelles qui semblent découler de l'emploi de l'auto-analyseur en sérologie de la syphilis.

Nous ne reprendrons pas en détail le plan de montage de l'appareil, pensant que ce sujet dépasse le cadre d'une revue de sérologie. La publication de VARGUES sus-mentionnée donne d'ailleurs un plan d'ensemble qui reste valable dans ses grandes lignes à l'heure actuelle.

Le principe appliqué dans la réaction de fixation du complément au moyen de l'auto-analyseur est celui d'une réaction de BORDET-WASSERMANN classique :

- le premier temps se fait en mettant en présence le sérum à étudier, l'antigène choisi et une quantité connue de complément. Le mélange réactionnel reste en contact pendant un temps fixé à l'avance par les caractéristiques du montage de l'appareil (montage qui peut être changé en quelques minutes).

- après le temps de fixation, on ajoute automatiquement (en faisant passer le mélange réactionnel par la pompe proportionnante) une quantité connue de suspension d'hématies sensibilisées. La sensibilisation des hématies se fait suivant la technique décrite dans la réaction de KOLMER.

PROBLEMES ACTUELLEMENT POSES PAR L'AUTO-ANALYSEUR

1) Titrage du complément

Le complément utilisé est un complément de cobaye lyophisé du commerce. Après reconstitution par son diluant spécial, on fait une dilution à 2 % ou à 5 % de ce complément. Par un tube de pompe calibré, on prélève un débit connu de ce complément. Par un autre tube de même calibre

on prélève un débit égal de tampon de LEWIN-MEYER qui reçoit de l'air et est envoyé sous forme de bulles dans le tube contenant la dilution initiale de complément. On voit donc que le tube du complément subit une dilution exponentielle continue à volume constant. La formule de cette dilution est :

$$C' = C'_o \cdot e^{-Kt}$$

On peut donc, connaissant le coefficient K qui dépend de l'appareil, le temps t qui est mesurable sur la courbe et la concentration initiale du complément (C'_o), calculer la concentration du complément qui permet encore l'hémolyse totale.

Si on résoud l'équation proposée, on obtient :

$$\text{Log} \frac{C}{C_o} = -Kt$$

K, coefficient de dilution est donné par le rapport entre le débit de pompage du complément et le volume de la dilution du complément.

Si D est le débit de pompage du complément et V le volume, on obtient :

$$\text{Log} \frac{C}{C_o} = -\frac{D}{V} t$$

soit

$$\text{Log } C = -\frac{D}{V} t - \text{Log } C_o$$

Bien entendu, le calcul est fait une fois pour toutes, et on utilise un tableau donnant $\frac{C}{C_o}$ en fonction de K et de t.

En fait, des difficultés pratiques viennent assombrir ce beau

procédé théorique. En effet, la courbe obtenue n'est pas la sigmoïde parfaite qui permettrait de tels calculs.

Au début de la courbe, le complément qui arrive dans le mélange réactionnel est du complément concentré. On devrait donc obtenir l'hémolyse totale d'emblée. Puis on devrait obtenir un plateau d'hémolyse, jusqu'à ce que la dilution de complément soit telle qu'elle ne suffise plus à entraîner l'hémolyse totale. La courbe devrait alors se présenter sous forme de sigmoïde passant par le point correspondant à 50 % d'hémolyse. L'unité d'hémolyse totale (CH 100) est représentée par le moint d'inflexion de la courbe lorsqu'elle quitte le plateau d'hémolyse totale. L'unité d'hémolyse 50 % (CH 50) devrait pouvoir être calculée à partir du point représentant la moyenne arithmétique entre le plateau d'hémolyse totale et le plateau d'ascence d'hémolyse. En multipliant par 2,5 la concentration de complément nécessaire pour obtenir l'hémolyse 50 % on devrait obtenir théoriquement l'unité de complément CH 100.

En fait, les courbes obtenues sont différentes de la courbe théorique ; on n'obtient pas d'emblée, l'hémolyse totale en pompant le complément en solution concentrée. Il y a un certain temps de latence pendant lequel le stylet inscripteur descend peu à peu vers la position d'hémolysetotale. A l'opposé, le passage entre l'hémolyse totale et l'absence d'hémolyse se fait en un temps très court, qui ne permet pas la mesure valable du point d'hémolyse 50 %.

Cependant, dans la pratique courante, le calcul à partir du point d'hémolyse totale donne des résultats satisfaisants pour le titrage du complément. Il n'en reste pas moins vrai que du point de vue théorique comme du point de vue pratique, la diminution des écarts entre la courbe théorique et les courbes obtenues en pratique doit être un des buts à atteindre. Certaines améliorations ont déjà été notées en faisant varier la pro-

portion des reactifs, le rapport entre le temps de fixation et le temps d'hémolyse, la densité de la suspension d'hématies de mouton et d'autres facteurs purement technologiques, tels que les raccords entre les différents tubes.

PROBLEMES DE CONTAMINATION

Dans l'auto-analyseur, les divers échantillons de sérums sont séparés par des bulles d'air et du liquide de lavage (du tampon de LEWIN-MEYER dans le cas de la fixation du complément). Tous les réactifs sont pompés en continu, seuls les sérums sont pompés d'une manière discontinue, séparés par le tampon. Si on pense à la concentration en anticorps d'un sérum fortement positif, on comprend qu'un autre sérum le suivant immédiatement pourra être influencé par un rinçage imparfait du tube de réaction.

C'est en effet le problème majeur qui se pose actuellement et qui empêche pour le moment, l'auto-analyseur d'être utilisé dans la pratique courante de la sérologie de la syphilis. Lorsqu'un sérum étudié en fixation du complément sur antigène cardiolipidique, présente une très forte positivité, et qu'un autre sérum le suit, la lecture de ce deuxième sérum est impossible.

Plusieurs techniques sont actuellement à l'étude pour éviter ces contaminations et on peut dire qu'une grande partie du travail est déjà faite. Sans vouloir entrer dans des problèmes purement technologiques, nous pouvons essayer d'exposer les directions de nos recherches actuelles :

- d'une part, nous essayons de diminuer le temps de pompage des sérums pour augmenter le rapport entre temps de pompage et temps de lavage. La quantité d'anticorps présents dans la réaction est retrouvée par l'augmentation de débit du pompage.

- d'autre part, les améliorations apportées au système de titrage du complément se retrouvent dans le passage des sérums étudiés.

En conclusion, nous pouvons dire que l'auto-analyseur nous paraît devoir améliorer sensiblement les conditions de réalisation de la technique de fixation du complément, une fois que seront résolus les quelques problèmes actuellement à l'étude.

Les avantages principaux de l'utilisation de l'auto-analyseur seront alors la parfaite reproductibilité de la technique, puisque tous les paramètres de la réaction seront standardisés automatiquement et ne pourront varier qu'en changeant le montage de l'appareil ; la persistance d'un document écrit pour chaque sérum, permettant d'éviter toute erreur d'interprétation au moment de la lecture. Ces documents pourraient d'ailleurs être conservés et permettraient la comparaison de deux sérums d'un même malade prélevés à des intervalles aussi éloignés qu'on le désire.

Enfin, la méthode de dilution exponentielle doit permettre de quantifier d'une manière parfaitement reproductible, la réaction de fixation du complément, ce qui est loin d'être le cas des réactions quantitatives actuellement utilisées.

ETUDE DE 108 SERUMS A L'AUTO-ANALYSEUR

Nous avons étudié 108 sérums en pratiquant simultanément :

- une réaction de KOLMER, en utilisant l'antigène cardiolipidique,
- une réaction de KLINE,
- un test d'immobilisation des tréponèmes,
- une réaction de fixation du complément sur antigène cardiolipidique réalisée à l'auto-analyseur.

Ces sérums avaient été pris au hasard, parmi ceux que reçoit le Laboratoire des Tests de NELSON de l'Hôpital Saint-Louis.

Les résultats sont donnés par le tableau V.

On peut constater qu'il y a une concordance entre la technique manuelle et l'auto-analyseur dans 74 % des cas :

- pour 41 sérums, les deux réactions sont positives ;
- pour 39 sérums, les deux réactions sont négatives.

Les discordances représentent 26 % des cas, parmi lesquels :

- pour 16 sérums (15 % des cas), l'auto-analyseur donne une réaction positive alors que la technique manuelle donne un résultat négatif ;

Parmi ces 16 sérums :

. 5 sérums présentent un test de NELSON positif

. 6 sérums présentent un test de NELSON et une réaction de KLINE positifs

. 5 sérums ne sont positifs que lorsqu'on les examine à l'auto-analyseur

= dont 3 ne présentent aucun antécédent connu de syphilis

= 1 provient d'un ancien syphilitique connu

= 1 provient d'un malade chez qui on a découvert une syphilis primaire confirmée par la découverte de tréponèmes à l'examen direct.

- 12 sérums sont positifs en technique manuelle, mais sont négatifs lorsqu'on les examine à l'auto-analyseur.

- 1 de ces sérums est négatif en test de NELSON mais donne une réaction de KLINE positive
- les 11 autres sérums sont positifs en test de NELSON, mais négatifs en réaction de KLINE.

Un sérum a été éliminé de notre étude, car nous avions décelé une contamination à la lecture des résultats. Ce sérum suivait un fort positif.

DISCUSSION

Sur 108 sérums, nous avons trouvé 3 sérums qui semblent être de faux positifs lorsqu'on les examine à l'auto-analyseur. Cette proportion de faux positifs nous paraît importante et devra d'une part être vérifiée, d'autre part, si elle est confirmée, devra être considérablement réduite par des modifications de l'appareil.

Par contre, l'auto-analyseur s'est montré plus sensible que la technique manuelle pour déceler 13 sérums de syphilitiques certains (12 % des cas). Il s'est montré moins sensible que la technique de KOLMER classique dans 11 % des cas (12 sérums). Il nous semble que la sensibilité de l'appareil peut être augmentée sans nuire à la spécificité de la méthode par divers artifices actuellement à l'étude.

Nous pouvons donc conclure de cette étude préliminaire que les résultats donnés par l'auto-analyseur sont comparables à ceux que l'on peut obtenir par une technique manuelle.

TABLEAU V

ETUDE DE 108 SERUMS A L'AUTO-ANALYSEUR

NELSON	KLINE	KOLMER MANUEL	AUTO ANALYSEUR	NOMBRE ABSOLU	%
+	-	-	-	10	10
+	+	-	-	22	20
+	-	+	-	11	10
+	-	-	+	5[a]	5
+	+	+	+	9	10
+	+	-	+	6	6
+	+	-	+	0	0
-	-	+	-	0	0
-	-	-	+	5[b]	5
-	+	+	-	1	1
-	+	-	+	0	0
-	+	+	+	0	0
-	-	-	-	39	36

a : 2 de ces sérums présentaient une immuno-fluorescence positive au 1/200
b : dont un sérum d'ancien syphilitique et un sérum de syphilis primaire vérifiée.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ANTICORPS INTERVENANANT DANS LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE SUR TREPONEMES PALES DE SOUCHE NICHOLS ET SUR TREPONEMES DE REITER

G E N E R A L I T E S

-:-:-:-

La réaction d'immuno-fluorescence appliquée au diagnostic de la syphilis est une réaction sensible et spécifique comme nous l'avons vu.

Il est certain que cette réaction fait intervenir plusieurs anticorps dirigés contre les tréponèmes. On sait que jusqu'à présent, le séro-diagnostic de la syphilis était basé sur la recherche de 3 anticorps : la réagine, décelée à l'aide du cardiolipide ; l'antiprotéine du groupe des tréponèmes pathogènes et non pathogènes, mise en évidence avec un antigène de REITER ; et l'immobilisine, anticorps spécifique des tréponèmes pathogènes, révélée par la réaction de NELSON.

PILLOT et BOREL (77) ont étudié les anticorps responsables de la réaction d'immuno-fluorescence, en examinant les sérums d'hommes atteints de syphilis, de pian ou de printa, des sérums humains ne renfermant que de la réagine et des sérums humains normaux. En épuisant ces sérums par du cardiolipide ou de l'extrait protéique de REITER, ils ont pu constater que :

- la réagine n'intervient pas dans la réaction d'immuno-fluorescence ;

- l'anti-protéine de groupe intervient dans cette réaction.

Nous avons vu qu'il existe des sérums de syphilitiques ne contenant pas d'anti-protéine de groupe (KOLMER-REITER négatifs) et donnant cependant une immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS.

ABSORPTION DE SERUMS DE SYPHILITIQUES SUR TREPONEMES DE REITER ET ETUDE EN IMMUNO-FLUORESCENCE DE CES SERUMS ABSORBES

-:-:-:-:-:-

I - TECHNIQUE D'ABSORPTION

1) PREPARATION DE LA SUSPENSION DE TREPONEMES DE REITER

Nous avons utilisé une culture jeune de tréponèmes pâles de souche REITER*, après centrifugation pendant 10 minutes à 1.800 g pour éliminer le milieu, nous avons procédé à 4 lavages successifs en solution tampon, en centrifugeant entre chacun des lavages 10 minutes à 1.800 g.

Nous avons ensuite repris le culot de centrifugation dans 10 ml de solution tampon (celle utilisée pour le test d'immuno-fluorescence).

2) ABSORPTION PROPREMENT DITE

Nous avons pratiqué successivement une absorption à 37°C pendant une heure, suivie d'une absorption à 4°C pendant 18 heures. Ces absorptions n'étant pas suffisantes, nous avons recommencé les mêmes opérations. Nous avons donc pratiqué pour chaque sérum 2 absorptions à 4°C et 2 absorptions à 37°C.

Dans un tube à hémolyse, nous avons placé :

- 0,5 ml de sérum
- 0,5 ml de suspensions de tréponèmes de REITER.

* Nous tenons à remercier le Docteur PILLOT, de l'Institut Pasteur, qui nous a fourni cette culture.

Les tubes furent placés au bain-marie à 37°C pendant une heure, en agitant toutes les 10 minutes.

Une centrifugation de 10 minutes à 1.800 g a permis de sédimenter les tréponèmes. Le surnageant fut repris à la pipette PASTEUR, très lentement pour ne pas entraîner de tréponèmes.

A 0,5 ml de surnageant on a jouté

0,5 ml de suspensions de tréponèmes de REITER.

Les tubes furent alors placés à + 4°C pendant 18 heures. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant fut de nouveau placé au contact de tréponèmes, à 37°C puis à 4°C.

Avant d'utiliser le surnageant dans le test d'immuno-fluorescence, nous avons toujours pris la précaution de rechercher des tréponèmes entre lame et lamelle au microscope à fond noir, pour éviter l'interférence de tréponèmes recouverts d'anticorps avec le test lui-même.

Il faut noter qu'à la fin de ces absorptions, le sérum se trouve dilué au 1/5. Pour obtenir la dilution 1/100, il faut utiliser 0,05 ml de sérum et 0,95 ml de solution tampon.

II - SERUMS ETUDIES

Nous avons étudié 12 sérums pris au hasard parmi les positifs de la routine d'immuno-fluorescence. Ces sérums étaient étudiés au test de NELSON et produisaient tous une immobilisation spécifique supérieure à 50 % et une immuno-fluorescence positive au moins au 1/400.

Comme témoins, nous avons pratiqué sur chaque sérum les mêmes

opérations que pour les absorptions (2 séjours à 37°C pendant 1 heure ; 2 séjours à 4°C pendant 18 heures, 4 centrifugations à 1.800 g pendant 10 minutes) mais en remplaçant la suspension de tréponèmes de REITER par le même volume (0,5 ml) de solution tampon.

III - RESULTATS

(tableau n° VI)

Aucun des témoins n'a varié de dilution ; ils étaient tous positifs à une dilution supérieure ou égale à 1/400 en immuno-fluorescence sur tréponèmes pâles de souche NICHOLS.

Les 12 sérums se sont négativés en immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER.

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS a montré que dans 9 sérums sur 12, le titre avait baissé.

Pour un sérum, l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS s'est montrée négative après absorption, alors que le témoin était positif à la dilution 1/400. Il s'agit du sérum de BRA... M. qui sera étudié d'une manière plus complète lorsque nous parlerons des neutralisations.*

* Nous remercions vivement le Docteur BELLAISH, de la maternité de l'Hôtel Dieu de Paris, qui a bien voulu nous faire parvenir à plusieurs reprises des échantillons du sang de cette malade.

TABLEAU VI

COMPARAISON DES SERUMS TEMOINS ET DES SERUMS APRES ABSORPTION SUR TREPONEMES DE REITER, EN IMMUNO-FLUORESCENCE QUANTITATIVE SUR LES DEUX SOUCHES DE TREPONEMES

IF - REITER

Sérum absorbé \ témoins	1/100	1/200	≥ 1/400
-	0	3	9
1/100	0	0	0
1/200	0	0	0
1/400	0	0	0

IF - NICHOLS

Sérum absorbé \ témoins	1/100	1/200	≥ 1/400
-	0	0	1*
1/100	0	0	2
1/200	0	0	6
1/400	0	0	3

* Il s'agit du sérum de BRA... M.

NEUTRALISATION DE SERUMS HUMAINS PAR UN ULTRASONNAT DE TREPONEMES DE REITER AVANT LEUR ETUDE EN IMMUNO-FLUORESCENCE

-:-:-:-:-:-:-

La technique que nous avons utilisée est celle décrite par HUNTER, DEACON et MEYER (41). Nous avons conservé notre méthode habituelle d'immuno-fluorescence, en remplaçant, dans la première dilution du sérum, le tampon par de l'ultra-sonnat de tréponème de REITER. Cet ultrasonnat nous a été aimablement fourni par le Docteur PILLOT. Il était préparé à partir d'une culture de tréponèmes de REITER de 5 jours, non lavés, dilués en tampon Veronal pH 8,1 et ultrasonné 10 minutes. Il était remis au volume initial après centrifugation et néomyciné à 100 gammas/ml. Nous utilisons cet ultrasonnat à la dilution 1/10.

RESULTATS PERSONNELS

1) Etude de 100 sérums négatifs

Il s'agissait de sérums provenant de donneurs de sang, sans antécédents connus de syphilis et négatifs en sérologie classique (réactions de KLINE et de KOLMER).

Dans un premier temps, nous avons étudié ces 100 sérums en immuno-fluorescence classique, aux dilutions 1/5, 1/50, et 1/100. Nous avons contrôlé qu'aucun de ces sérums ne donnait de fluorescence au 1/100. Par contre, 37 sérums étaient positifs au 1/5 en immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS ; la moitié environ de ces sérums donnait encore un test d'immuno-fluorescence positif au 1/50.

Dans un second temps, nous avons étudié ces sérums en les diluant au moyen de l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, tel que nous

l'avons défini (au 1/10). L'immuno-fluorescence après neutralisation a été pratiquée à 3 dilutions : 1/10, 1/20 et 1/50.

Nous avons pu constater que :

- 10 sérums étaient positifs au 1/10 après neutralisation
  dont 1 était positif au 1/50
- 25 sérums étaient suspects au 1/10 après neutralisation
  dont 15 étaient encore suspects au 1/20
  et 9 étaient suspects au 1/50
- 2 sérums seulement étaient négatifs au 1/10 après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

2) Etude de 20 sérums provenant de syphilitiques certains

Aucun choix particulier n'a été effectué pour isoler ces sérums, à part celui de BRA... M. (sérum n° 18) que nous avions déjà étudié après absorption sur tréponèmes de REITER.

Nous avons constaté que parmi ces sérums :

- 11 avaient une immuno-fluorescence inchangée après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER ;
- 9 présentaient une nette diminution de leur immuno-fluorescence (égale à deux dilutions au moins) après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Nous étudierons brièvement l'histoire clinique et sérologique de chacun de ces malades, en les divisant en deux groupes : les sérums ne présentant pas de diminution de l'immuno-fluorescence et ceux présentant une nette perte de sensibilité après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

A/ Sérums ne présentant pas de baisse du titre d'immuno-fluorescence après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Sérum n° 1 : MOR... F.

Au cours de l'examen systématique au 3ème mois de sa grossesse, on a trouvé chez l'épouse de ce malade une sérologie positive (sérum n° 12)

L'examen clinique de ce malade s'est avéré négatif

Le contrôle sérologique a montré :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : ++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : négative
- test d'immobilisation des tréponèmes
  immobilisation spécifique : 60 %

L'immuno-fluorescence était positive au 1/100

Après neutralisation du sérum sur ultrasonnat de tréponème de REITER, l'immuno-fluorescence reste positive au 1/50.

Sérum n° 2 : MEN... J. 34 ans

Ce malade a présenté une syphilis, traitée en 1964. Le 22 Août, il présente un test d'immobilisation des tréponèmes : immobilisation spécifique 100 %.

Le 22 Février 1965, sa sérologie est la suivante :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : suspecte

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS, pratiquée à cette date est positive au 1/400.

Après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence reste positive au 1/200.

Sérum n° 3 : MEN... S. 36 ans

Cette malade a présenté une syphilis primaire en 1964, traitée depuis cette date. Le 5 Septembre 1964 : test d'immobilisation des tréponèmes négatif.

Le 22 Février 1965 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : suspecte

L'immuno-fluorescence pratiquée à cette date est positive au 1/400, avant et après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Sérum n° 4 : KOB... D. 54 ans

Syphilis primaire diagnostiquée en Décembre 1964 et traitée immédiatement.

Le 29 Décembre 1964, ses réactions sérologiques étaient :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : ++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : ++
- réaction de KLINE : suspecte

Le test d'immuno-fluorescence pratiqué sur ce sérum, est posi-

tif au 1/200 et reste positif au 1/100 après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Sérum n° 5 : ROC... H.

En 1958, un examen sérologique systématique découvre une syphilis latente.

Le 22 Février 1965, la sérologie de ce malade se présente ainsi :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : +

On pratique une réaction quantitative de KOLMER sur antigène de REITER, qui se montre positive à 4 unités.

Le test d'immuno-fluorescence est positif au 1/400 et ne varie pas après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Sérum n° 6 : POT... J. 26 ans

En 1964, on découvre chez ce malade une syphilis secondaire, qui est immédiatement traitée.

Le 3 Octobre 1964, le test d'immobilisation des tréponèmes montre une immobilisation spécifique à 100 %.

Le 12 Septembre 1964, la sérologie de ce malade se présente ainsi :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction quantitative de KLINE : 4 unités

Le 22 Février 1965, les réactions sérologiques sont beaucoup moins positives :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : négative

L'immuno-fluorescence est positive au 1/400 avant neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER ; positive au 1/200 après cette neutralisation.

Sérum n° 7 : HAN...C. 50 ans

Ce malade a présenté une syphilis secondaire en Décembre 1964. Le 22 Février 1965, les réactions sérologiques se présentent ainsi :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : ++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : +
- test d'immobilisation des tréponèmes
  immobilisation spécifique : 87 %

Avant comme après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS est positive au 1/400.

Sérum n° 8 : TAT... J. 61 ans

On a découvert à l'examen systématique une syphilis sérologique (malade vue pour un ulcère de jambe).

Le 19 Juillet 1955 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : ++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction quantitative de KLINE : 2 unités
- réaction de REIN-BOSSAK : +

Le 28 Mars 1963 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : +
- réaction de REIN-BOSSAK : +

Le 23 Février 1965 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : ±

On pratique une réaction quantitative de KOLMER qui est positive à 4 unités.

L'immuno-fluorescence est positive au 1/200 par la méthode classique et reste positive au 1/200 après neutralisation.

Sérum n° 9 : AUB... Cl. 23 ans

A présenté en Septembre 1964 une syphilis secondaire traitée par 3 millions de Biclinocilline.*

Il présentait alors :

- une réaction de KLINE positive à 16 unités

- un test d'immobilisation des tréponèmes
  immobilisation spécifique = 100 %
- un test d'immuno-fluorescence positif au 1/1.600

La surveillance sérologique montre une décroissance de la positivité des réactions :

- le 7 Novembre 1964 : réaction de KLINE positive à 4 unités
- le 9 Janvier 1965 : réaction de KLINE : ++
- le 28 Janvier 1965 :
  - réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
  - réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
  - réaction de KLINE : suspecte
  - immmobilisation des tréponèmes
    immobilisation spécifique : 100 %
  - immuno-fluorescence positive au 1/400

Le 22 Février 1965, il semble présenter une récidive : on note de petites eczématides au niveau du visage ainsi que des vésicules hermétiformes au niveau du gland et une adénopathie inguinale atypique.

Le 22 Février 1965, les réactions sérologiques pratiquées, montrent :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction quantitative de KLINE : positive à 16 unités
- test d'immuno-fluorescence positif au 1/3.200

Le 18 Mars 1965 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction quantitative de KLINE positive à 8 unités
- test d'immuno-fluorescence positif au 1/3.200

Un test de KOLMER quantitatif est alors pratiqué : positif à 32 unités.

Après neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence reste positive au 1/3.200.

Sérum n° 10 : TUR... G. 71 ans

Cette malade, âgée de 71 ans, se sait porteuse d'un tabès et d'une insuffisance aortique, que l'on retrouve effectivement à l'examen clinique (signe d'ARGYLL-ROBERTSON, souffle diastolique). Elle dit avoir eu un chancre syphilitique à l'âge de 17 ans et avoir été traitée pendant plusieurs années.

Ses examens sérologiques pratiqués en Février 1965 montrent :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : suspecte

Le test d'immuno-fluorescence pratiqué sur tréponèmes de NICHOLS est positif au 1/400 avant et après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

De même dans le liquide céphalo-rachidien de cette malade :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS :

avant neutralisation : positif au 1/50
après neutralisation : positif au 1/50

Sérum n° 11 : YAN... Y. 58 ans

Nous avons peu de renseignements cliniques concernant ce malade. Nous savons seulement qu'il présentait un signe d'ARGYLL-ROBERTSON.

Le 22 Février 1965, sa sérologie était très positive :

- réaction de KOLMER pratiquée sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : ++
- réaction de REIN-BOSSAK : +++

L'immuno-fluorescence pratiquée sur tréponèmes de NICHOLS est positive au 1/400 avant neutralisation et au 1/200 après celle-ci.

B/ Sérums présentant une nette diminution du taux des anticorps décelés par immuno-fluorescence, après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Sérum n° 12 : MOR... M.

Il s'agit d'une femme enceinte de 5 mois, 3ème geste.

On découvre chez elle une sérologie positive au cours de l'examen systématique. Aucun traitement n'est institué.

Le contrôle sérologique effectué montre :

- une réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +
- une réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- une réaction de KLINE : suspecte
- un test d'immobilisation des tréponèmes
  immobilisation spécifique = 100 %

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS est découverte positive au 1/3.200

Après neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS n'est positive qu'au 1/100. On constate donc une baisse de 5 dilutions de raison 2.

Sérum n° 13 : BOU... G. 51 ans

Ce malade a présenté une syphilis primaire en 1956. Il a été traité immédiatement.

Sa sérologie a été constamment négative, sauf un test d'immuno-fluorescence positif au 1/3.200 en Février 1965.

Après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, le test d'immuno-fluorescence est négatif au 1/5. On peut donc conclure à une disparition totale des anticorps entraînant une fluorescence des tréponèmes.

Sérum n° 14 : EMD... M.

A présenté en 1962 une syphilis primaire, traitée par 15 millions de Flocilline*, puis 3 séries de Bispecia.*

Le 11 Février 1965, l'étude sérologique de ce sérum montre:

- une réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- une réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- une immuno-fluorescence positive au 1/200

Après neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence est positive au 1/20, négative au 1/50.

Sérum n° 15 : IMB... J. 44 ans

Il s'agit d'une découverte sérologique chez un donneur de sang, qui présentait :

- une réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- une réaction de KOLMER sur cardiolipide : suspecte
- une réaction de REIN-BOSSAK : suspecte

Le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS avant neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER est positif au 1/400, négatif au 1/20 après cette neutralisation.

Sérum n° 16 : MEN... F. 25 ans

On a diagnostiqué chez ce malade une syphilis secondaire, qui a été traitée.

Le 10 Septembre 1964, on obtient comme résultats de la sérologie :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- réaction de KLINE : 8 unités

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS est positive au 1/1.600

Le test d'immobilisation des tréponèmes montre une immobilisation spécifique à 95 %.

Le 23 Février 1965, la sérologie est presque négative :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : suspecte

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS est positive au 1/100. Après neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, l'immuno-fluorescence n'est positive qu'au 1/20.

Sérum n° 17 : PAT... R.

Ce malade présente une syphilis secondaire. Ses examens sérologiques pratiqués montrent :

- une réaction de KOLMER sur antigène de REITER : +++
- une réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
- un test d'immobilisation des tréponèmes
  immobilisation spécifique = 100 %

L'immuno-fluorescence pratiquée sur tréponémes de NICHOLS se montre positive à la dilution de 1/25.600 Après neutralisation du sérum par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, le test d'immuno-fluorescence est positif au 1/6.400, soit une baisse de 2 dilutions.

Sérum n° 18 : BRA... M.

Ce sérum a déjà été étudié en absorption sur tréponèmes de REITER.

Il s'agit d'une femme enceinte, chez qui l'examen systématique a montré, le 16 Septembre 1964 :

- réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
- réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative
- réaction de KLINE : suspecte

Le test d'immobilisation des tréponèmes montre une immobilisation spécifique à 87 %.

Le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS est positif au 1/400. Après neutralisation, il est négatif au 1/100. De même, l'absorption de ce sérum sur tréponèmes de REITER avait négative l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

Cette malade reçoit alors 15 millions d'unité de pénicilline au mois d'Octobre 1964.

- le 9 Mars 1965, les tests sérologiques pratiqués, montrent :
  - une réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
  - une réaction de KOLMER sur cardiolipide : +++
  - une réaction de KLINE : ++
  - une réaction de REIN-BOSSAK : +++
- le 18 Mars 1965 :
  - réaction de KOLMER sur antigène de REITER : négative
  - réaction de KOLMER sur cardiolipide : négative

- réaction de KLINE : négative

L'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS est positive au 1/400.

Le test de NELSON-MAYER montre une immobilisation spécifique à 68%

Après absorption du sérum par les tréponèmes de REITER, comme après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, le test d'immuno-fluorescence est négatif au 1/100.

DISCUSSION DES RESULTATS DES NEUTRALISATIONS & DES ABSORPTIONS DE SERUMS : ROLE DE L'ANTIPROTEINE DE GROUPE DANS L'IMMUNO-FLUORESCENCE

-:-:-:-:-:-

Nous noterons tout d'abord que, contrairement à la terminologie de HUNTER, DEACON et MEYER (41), nous appelons neutralisation, le fait d'étudier un sérum après adjonction d'un ultrasonnat de tréponèmes de REITER. Nous réservons le terme d'absorption au fait de laisser en contact un sérum avec ces tréponèmes et de retirer ces tréponèmes par centrifugation.

Les auteurs précités ont conseillé l'utilisation de la neutralisation des sérums par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER pour accroître la spécificité du test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes pâles. Ils nomment cette variante du test d'immuno-fluorescence le FTA-abs (immuno-fluorescence absorbée). Les sérums sont alors dilués au 1/5 (4/5 d'ultrasonnat et 1/5 de sérum) et c'est à cette dilution qu'ils effectuent le test d'immuno-fluorescence.

Ils étudient 76 sérums provenant de malades atteints de syphilis primaire et 74 sérums provenant de donneurs sains, sans antécédents syphilitiques connus et ayant une sérologie négative ; leurs résultats montrent que par rapport à l'immuno-fluorescence classique, pratiquée à la dilution de 1/200, la sensibilité est doublée, sans perte de spécificité : en effet, 19,7 % de leurs témoins négatifs sont positifs en immuno-fluorescence au 1/5 avant neutralisation, alors que tous se négativent après neutralisation. On notera que ce chiffre de 19,7 % de réactions faussement positives au 1/5 est inférieur à celui de 37 % que nous observons à cette dilution, mais cette différence n'est peut-être pas significative, étant donné le faible nombre de sérums étudiés dans leur matériel et dans le nôtre.

Par contre, les divergences sont très importantes en ce qui concerne l'étude des sérums après neutralisation. En effet, pour HUNTER et collaborateurs, la neutralisation rend spécifique, une réaction pratiquée à la dilution 1/5. Pour nous, la spécificité de ce test, pratiqué au 1/5 est très mauvaise, puisque sur 100 sérums provenant d'individus non syphilitiques, 10 % étaient positifs au 1/10 et 25 sérums étaient suspects à cette même dilution. Nous avons même trouvé après neutralisation, un sérum positif au 1/50 et 9 sérums suspects à cette dilution.

La neutralisation des sérums ne permet donc pas de baisser de façon utile, la dilution initiale à partir de laquelle on peut faire un test d'immuno-fluorescence.

De plus, nous avons montré que dans 9 cas sur 20 de syphilitiques avérés, la positivité de l'immuno-fluorescence était abaissée d'au moins 2 dilutions après neutralisation. C'est ainsi que dans 5 cas de notre étude (sérums Nos 13, 14, 15, 16, 18) l'immuno-fluorescence après neutralisation par l'ultrasonnat de tréponèmes de REITER, a été trouvée négative au 1/100 ou même à une dilution inférieure alors qu'il s'agissait de syphilis authentiques, tant du point de vue clinique que sérologique. Ces 5 Sérums présentaient avant neutralisation, une fluorescence positive sur tréponèmes de NICHOLS.

Les résultats de l'absorption des sérums par des tréponèmes de souche REITER sont très comparables : 1 sérum sur 12 est complètement absorbé sur ces tréponèmes, puisque l'immuno-fluorescence qui était positive au 1/400 devient négative au 1/100.

- 6 sérums sur 12 voient leur titre diminuer de 1 dilution ;
- 2 sérums sur 12 voient leur titre diminuer de 2 dilutions ;
- 3 sérums sur 12 sont positifs à la même dilution en immuno-

fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS, avant et après absorption par les tréponèmes de REITER.

Nous pouvons donc dire que, dans la majorité des cas, l'absorption ou la neutralisation des sérums de syphilitiques par les tréponèmes de REITER, fait baisser le taux de l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS.

Il est ainsi confirmé, comme l'avaient déjà démontré PILLOT et BOREL (77) que l'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS, révèle l'antiprotéine de groupe, qui correspond à l'antigène protéique commun à tout le groupe des tréponèmes.

A l'appui de cette thèse, vient s'inscrire le fait que les sérums positifs en réaction de KOLMER pratiquée sur antigène de REITER, ont toujours été trouvés positifs en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

Le fait que certains sérums soient trouvés positifs en immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER et négatifs en réaction de KOLMER pratiquée sur antigène de REITER peut s'expliquer de 2 façons : ou bien la réaction d'immuno-fluorescence est plus sensible que la réaction de KOLMER pour déceler l'antiprotéine de groupe ; ou bien l'immuno-fluorescence décèle d'autres anticorps du groupe des tréponèmes que les anticorps fixant le complément.

Cette dernière hypothèse est renforcée par l'absence de corrélation quantitative satisfaisante entre la réaction de KOLMER et le test d'immuno-fluorescence, pratiqués sur antigène de REITER.

De plus, d'après PILLOT et collaborateurs (75-77-78) lorsqu'un sérum contient de l'antiprotéine de groupe, il est toujours trouvé positif en fixation du complément sur antigène de REITER.

CONCLUSION

I - ETUDE STATISTIQUE

1) La sérologie classique utilisant l'antigène cardiolipidique.

comportant deux réactions : la réaction de floculation de KLINE et la réaction de fixation du complément de KOLMER, a été étudiée comparativement au test de NELSON-MAYER sur 3.326 sérums. On a trouvé :

- 9 % de tests négatifs en sérologie classique et positifs avec le test de NELSON-MAYER ;
- 4 % de sérums donnant la discordance inverse ; parmi ces derniers

  1/4 seulement correspondaient à des sérums de syphilitiques, comme l'indique l'anamnèse.

La sérologie classique est donc un test relativement sensible, mais donnant une fausse positivité dans 3 % des cas.

2) La réaction de fixation du complément de KOLMER pratiquée sur antigène de REITER

a été étudiée selon les mêmes critères. On a trouvé 24 % des tests faussement négatifs et 1 % de tests positifs en excès par rapport au test de NELSON-MAYER. Parmi ces derniers, les 3/4 des sérums provenaient de syphilitiques. Cette réaction ne donne donc que 0,25 % de tests biolo-

giques faussement positifs.

La réaction de KOLMER utilisant l'antigè e de REITER est nettement moins sensible, mais plus spécifique que la sérologie cardiolipidique.

3) Le test d'immuno-fluorescence pratiqué sur tréponèmes pâles, étudié selon les mêmes critères, montre :

- 5 % de tests faussement négatifs ;
- 5 % de tests positifs en excès, ces derniers appartenant tous à des syphilitiques certains.

II - ETUDE DES ANTIGENES RESPONSABLES DE LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE

Des réactions d'immuno-fluorescence ont été effectuées en comparant les résultats obtenus sur tréponèmes pâles de souche NICHOLS à ceux obtenus sur tréponèmes de souche REITER.

L'absorption de sérums positifs en immuno-fluorescence sur tréponème de souche NICHOLS sur des tréponèmes de REITER entiers, a montré que :

- certains sérums gardent le même titre de positivité en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS ;
- certains autres, au contraire, voient leur titre diminué de 2 à 3 dilutions géométriques de raison 2.

Les mêmes résultats sont obtenus si les sérums sont, non plus absorbés, mais neutralisés par un ultrasonnat de tréponèmes de REITER.

Ces faits incitent à penser que dans les sérums de syphilitiques, positifs en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS, il existe en fait au moins deux anticorps, dont l'un est actif seulement sur trépo-

nèmes de souche Nichols, et l'autre est actif sur les deux tréponèmes. Il s'agit donc probablement de l'antiprotéine de groupe.

Exceptionnellement, l'absorption ou la neutralisation des sérums par le tréponème de REITER peut entraîner sa négativation en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS. Dans ces rares sérums n'existerait que l'anti-protéine de groupe.

III - ESSAI D'UTILISATION DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE SUR TREPONEMES DE REITER EN ROUTINE.

Pour apprécier la valeur en routine de l'immuno-fluorescence pratiquée sur tréponèmes de REITER, deux groupes de sérums ont été étudiés :

1) les sérums faussement négatifs par la réaction de fixation du complément de KOLMER, pratiquée sur antigène de REITER.

La moitié de ces sérums seulement s'est montrée positive par le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de REITER alors qu'ils étaient tous positifs en immuno-fluorescence pratiquée sur tréponèmes pâles de souche NICHOLS.

2) des sérums faussement positifs par la même réaction.

Là encore, la moitié seulement des sérums est restée négative en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche REITER, alors qu'ils étaient tous négatifs en immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

IV - On a cherché à confirmer l'affirmation de HUNTER, DEACON et MEYER, selon laquelle UNE NEUTRALISATION PREALABLE DES SERUMS PAR L'ULTRASONNAT DE TREPONEMES DE REITER permettait d'éliminer la fluorescence aspécifique qui gêne considérablement l'interprétation de l'immuno-fluorescence pra-

tiquée sur tréponèmes pâles de souche NICHOLS. Nos résultats ne permettent pas cette confirmation.

V - LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE SUR TREPONEMES PALES DE SOUCHE NICHOLS

telle qu'elle est pratiquée au Laboratoire de Sérologie de l'Hôpital Saint-Louis, donne des résultats d'une aussi haute valeur que le test d'immobilisation des tréponèmes, mais ces deux tests présentent des indications différentes :

1) Dans les syphilis primaires, le test d'immuno-fluorescence apporte une affirmation du diagnostic plus précoce que le test de NELSON-MAYER. L'apparition de ce dernier en même temps que l'immuno-fluorescence signe une récidive.

Devant la découverte d'une syphilis, il est recommandé de pratiquer les deux tests.

2) Pour suivre l'évolution d'une syphilis traitée, le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS apporte une information quantitative précieuse, le test de NELSON-MAYER quantitatif étant encore très discuté et présentant des difficultés pratiques pour sa réalisation sur un grand nombre de sérums. Pendant cette période, seul le test d'immuno-fluorescence est nécessaire.

3) Dans les syphilis tardives, par contre, le test d'immobilisation des tréponèmes peut être positif alors que le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de NICHOLS est négatif. C'est dans ce cas que son contrôle par un test de NELSON-MAYER s'avère utile. Nous ne connaissons pas la signification clinique des cas où un test de NELSON-MAYER est positif alors que le test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS est négatif. S'agit-il d'une syphilis qui pourra un jour se réveiller ?

EN RESUME

du point de vue pratique, il nous semble que l'on doive continuer à pratiquer la sérologie classique cardiolipidique, associée à la réaction de KOLMER pratiquée sur antigène de REITER, à titre de dépistage ; mais ces tests doivent être systématiquement vérifiés, lorsqu'ils sont positifs, par un test d'immuno-fluorescence sur tréponèmes de souche NICHOLS.

Le test d'immobilisation des tréponèmes sera pratiqué systématiquement, d'une part au début de la maladie, d'autre part lorsque le test d'immuno-fluorescence s'est négativé.

Vu : Le Président de Thèse

J. BERNARD

Vu : Le Doyen

G. CORDIER

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

1-ALI MOHAMED et EL DAL MAMONY A. The result of the serological examination of 257 lepers and 527 non-lepers for syphilis by the Wassermann's and the Kahn's flocculation tests .

Jl. Egyp.of Med. Assoc. 1931,14,6,394

2- ALBERTY R.A. et BALDWIN R.L. Mathematical theory of immune hemolysis .

Jl. Immun. 1961,66,725

3- D'ALLESSANDRO G. et DARDONI L. L'antigene proteico del Treponema coltivable di Reiter .

Riv. Ist. Sieroter. Ital. 1952,27,153-172

4- D'ALLESSANDRO G. et DARDONI L. Isolation and purification of the protein antigen of the Reiter treponema .

Amer. Jl.Syph. 1953,37,137-150

5- D'ALLESSANDRO G, DARDONI L. et ZAFFIRO P. Della reazione di Wassermann al test di Nelson e Mayer (antigeni treponomici ed anti-corpi del siero di sifilitico)

Minerva Derm. 1955,30,2-23

6- BABIN F. et DULANEY A. La fixation du complément dans le paludisme et la syphilis .

Amer. Jl. Hyg. Sept.1945,167

7- BADGER L.F. Significance of positive Wassermann and Kahn reactions in leprosy .

Public Health Depart. April 1931,v.46,17,957

8- BAYLET R. Enquête sérologique en milieu africain .

Med. Trop. Déc.1950

9- BENAZET F.,BROTTES H., THIVOLLET J. et SOHIER R. Etude comparée de la réaction d'immobilisation de Nelson-Mayer et des réactions de fixation du complément effectuées avec les antigènes tréponémiques (souche Reiter)^ et les antigènes cardiolipidiques .

Ann. Inst. Pasteur 1954,86,674

10- BERNER J.J., KING J.W., et REICH A. Evaluation of the Reiter protein complement fixation test for syphilis .

Cleveland Clinic Quarterly, 1960,27,163-173

11- BOLGERT M. et LEVY G. Valeur des réactions quantitatives . Existe -t'il des réactions faussement positives chez les syphilitiques traités ?

Presse Méd. 1954,62,218

12- BOREL L.J. et DUREL P. L'immuno-fluorescence appliquée au diagnostic de la syphilis .

Path. Biol. 1959,7,2517-2525

13- BOREL L.J., DAGUET G.L., et FERNANDEZ D. L'immuno-fluorescence appliquée au diagnostic de la syphilis .

Ann. Biol. Clin. 1961,1,1-9

14- BROTTES H. Réactions de fixation du complément utilisant les antigènes tréponémiques (souche Reiter) .

1954 Trévoux imp.

15- De BRUIJN J.H. Reiter treponema in syphilis serology .

Brit.Jl. Ven. Dis. 1962,38,3,126-130

16- CASTETS M. Sérologie de la syphilis et protidémie chez les Africains de Dakar .

Librairie Arnette Paris -1958

17- CHARPY J. (sous la direction de) Le T.P.I. - Test de Nelson-Mayer et les nouveaux aspects immunologiques de la syphilis .

Masson éd. Paris 1953

18- CHRISTIANSEN A.H. Etude sur la structure antigénique de Treponema pallidum .

WHO/VDT/RES/41/9 Août 1963

19- COLOMBANI J. et RIPAULT J. Le test d'immuno-fluorescence appliqué au diagnostic de la syphilis . Comparaison avec le Test de Nelson et la sérologie classique .

Path. et Biol.1964,12.1-2,56-64

20- COVERT S.V., KENT J.F. et STEVENS R.W. Fluorescent treponemal antibody test using the Reiter Treponeme .

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1961,106,729-731

21- DAGUET G. L'aide de la sérologie et de l'immunologie au diagnostic de la syphilis .

Rev. Prat. 1964,14,1815-1836

22- DARDONI L. Solubilizzazione dll'antigene proteico del T.pallidum (ceppo di Reiter) trattato con ultrasuoni .

Boll. Soc.ital. Biol. Sper. 1952,28,60-63

23- DARDONI L. Epoca di comparasa degli anticorpi antilipoidei antitreponemici di gruppo e immobilizzanti nel coniglio inoculato con treponema pallidum .

Riv. Ist. Sieroter.ital. 1955,30,414-423

24- DEACON W.E., FALCONE V.H., et HARRIS A.

Proc. Soc. Exp. Biol. 1957,96,477-480

25- DEACON W.E., FREEMAN E.M. et HARRIS A.

Proc. Soc. Exp. Biol. 1960,103,827-829

26- DEGOS R. La recrudescence de la syphilis et les moyens médico-sociaux d'y parer .

Rev. Prat. 1964,14,1775-1786

27- DEMANCHE R. Les fausses réactions positives de la syphilis .

Paris Médical 24 Janvier 1948, P.61

28- DEMANCHE R. Epreuve d'immobilisation des tréponèmes de Nelson et Mayer .

Paris Médical 1951,35,396

29- DUFFRENE A. Antigènes tréponémiques utilisables pour le diagnostic sérologique de la syphilis .

Thèse Pharmacie Lyon 1958

30- DUPOUEY P. Comparaison par des techniques immunologiques de six espèces de tréponèmes anaérobies d'origine génitale .

Thèse Médecine Paris 1962

31- DUREL P. Sur les réactions sérologiques à antigènes tréponémiques .

Minerva Derm. 1955,30,11

32- DUREL P. et SAUSSE A.

Bull. Soc. Franç.de Derm. et Syph. 1964,61,139

33- FRIBOURG-BLANC A. et NIEL G. Le diagnostic sérologique de la syphilis par la technique d'immuno-fluorescence .

Presse Méd. 1962,70,41,1875

34- FIUMARA N.J. Biological false positive reaction for syphilis

New England Jl. Méd . 1963,268,402-405

35- FRIBOURG-BLANC A. Sensibilisation par le lysozyme du test d'immobilisation des tréponèmes .

Ann. Inst. Pasteur 102,460-468

36- GAETHGENS W. Ueber die antigen Wirkung von Pallida suspension in Karbolisieteb Kochsalzlösung .

Med. Kli. 1929,25,390

37- GASTINEL, HAMELIN, VAISMAN et DUNOYER

Ann. Inst. Pasteur 1958,94,249

38- GERMAIN A. et BORY J. Utilisation de l'antigène de Reiter dans les réactions de déviation du complément .

Ann. Biol. Clin. 1961,19, 715-727

39- GRIMSTONE A.V.

Quart. J. Microsc. Sci. 1963, 104, 145

40- HAMELIN A. Les antigènes tréponémiques dans le séro-diagnostic de la syphilis .

Thèse Pharmacie Paris 1959

41- HEDERSTEDT B. et SKOG E. Le test quantitatif d'immobilisation de Treponema pallidum dans la syphilis récente .

WHO/VDT/RES/50-27 Février 1964

42- HUNTER E.F., DEACON W.E. et MEYER P.E. An improved FTA test for syphilis The absorption procedure (FTA-Abs.)

Public Health Reports 1964,79,410-412

43- KAHN R.L. The Kahn test .

The Williams and Wilkins C° Baltimore 1928

44- KAWATA T.

Japan Jl. Microb. 1961,5, 203

45- KELLOG S. et DEACON W.E. L'identification de treponema pallidum et de Neisseria gonorrhoae par un nouveau procédé rapide d'immuno-fluorescence .

WHO/VDT/RES/GON/ 7-64

46- KENT J.F. et De WEERDT J.B. Enhancement by lysozyme of the sensitivity of the treponema pallidum immobilzation tests .

Brit. Jl.ov Ven. Dis. (1963), 39, 37

47- KENT J.F., COVERT S.V., REILLY H.W., KINCH W.H. et LANSON W.B. Evaluation of the Fluorescent Trpeonemal antibody and other tests for syphilis .

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 109, 584-589

48- KJELLANDER J., SIEVERS O., et VOGELSAND Th. M. A further comparison between the Reiter protein fixation test and the treponema pallidum immobilization test .

Acta path. Microb. scand . 1962,56,4

49- KOLMER J.A. , KAST C. et LYNCH E.R. Studies on the role of Sp. pallida in the Wassermann reaction (1). Complement fixation in syphilis leprosy and malaria with spirochetal antigens .

Amer. Jl. Syph. 1941,25,412

50- KOLMER J.A. The technique of complement fixation for syphilis employing one-fifth amount of reagents .

Amer. Jl. Clin. Path. 1942,12,109-115

51- KOURILSKY R., PIERON R., KOURILSKY S., ROBINEAUX R. et VOISIN G. Recherche sur le mécanisme de l'immuno-adhérence .

Ann. Inst. Pasteur 1955,89,273-279

52- LEVADITI C. Les immobilisines anti-tréponémiques .

Presse Méd. 1960,59,1361-1363

53- LISTARGEN M.A. LOESHE W.H. et MAYALL B.H.

Canad.Jl. Microb. 1963,85, 932

54- MARIE J., HERZOG F., BADILLET M. et GAIFFE M. Le diagnostic de la coqueluche par immuno-fluorescence .

Pédiatrie XIX,1,1964,53-59

55- MERKLEN F.P., BERTHAUX P. et MIKOL C. Sérologie .

Revue Prat. 1961,XI, 14

56- MERKLEN F.P. Bases et intérêt pratique des réactions quantitatives dans la sérologie de la syphilis .

Hôpital Paris 1955,43,210-214

57- METGER M., HARDY P.H. et NELL E.E. Influence of lysozyme upon the trponeme immobilisation test .

The Amer. Jl. Hyg. 73,2,236-244

58- MILLER J.N. et coll. Multiple Laboratory Evaluation of the Reiter Protein Fixation Method .

Calif. Med. 1961,94,4,203-208

59- MILLER et WILSON

J.Bact. 1962, 84, 569

60- MOORE J.E. et MOHR C.F. Biologically false positive serologic tests for syphilis : type, incidence and cause .

Jl. Amer. Med. Assoc. 150,467,1952

61- MOORE J.E. Les épreuves sérologiques biologiques de la syphilis faussement positives : leurs relations avec l'anticorps tréponémicide .

Bull. Soc. Franç. Derm. et Syph. 1949, 56, 273-275

62- NELSON R.A. et MAY ER M.M. Treponemal Immobilization test of normal and syphilitic serum .

Jl. Exp. Med. 89, 369-393

63- NELSON R.A. et MAYER M.M. Immobilization of virulent treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection .

Jl. Exp. Med . 89,369,1949

64- NELSON R.A. Le test d'immobilisation des tréponèmes et le phénomène de l'adhérence disparition dans la syphilis .

Presse Méd. 1952,60, 1719-1721

65- NELSON R.A., ZHEUTLIN H.E.C., DIESENBRUCK J.A. et AUSTIN P.G.M. Studies on treponema pallidum immobilising antibodies in syphilis ; incidence in serum and cerebrospinal fluid in human beings and absende in "biological false reactors" .

Amer. Jl. Syph. 34, 101

66- NELSON R.A. The immune-adhérence phenomenon . On immunologcally specific reaction between microorganism and erythrocytes leading to enhanced Phagocytosis .

Science 1953, 118, 733-737

67- NIEL et FRIBOURG-BLANC . Immuno-fluorescence quantitative et sérologie de la syphilis .

WHO/VDT/RES/34 . 2 Avril 1963

68- NIEL G. et FRIBOURG-BLANC A. Technique actuelle du test d'immuno-fluorescence appiqué au diagnostic de la syphilis .

Ann.Inst. Pasteur Mai 1962,102, 616-628

69- NIEL G. et FRIBOURG-BLANC A. Evolution des anticorps fluorescents aux premiers stades de la syphilis expérimentale .

WHO/VDT/RES/ 54 - 1° Mai 1964

70- NIELSEN H.Aa. Investigations of the reproductibility of the quantitative treponema pallidum immobilisation test .

Acth. Path. Microb. Scand. 40, 119, 1957

71- NOGUCHI H. A method for the pure cultivation of pathogenic T. pallidum .

Jl. Exp. Med. 1911,14,99

72- NOGUCHI H. Experimental research in syphilis with special reference to Spirochaeta pallida .

J.A.M.A. 1912,58, 1163

73- OSLER A.G. et HILL B.M. Kinetic studies of complement fixation .

Jl. Immunology . 1955,75, 137

74- PATTON R.B. et GAURIE A. An evaluation of Reiter complement fixation test in the diagnosis of syphilis .

The Amer. Jl. Clin. Path. 1961, 36, 5, 383-389

75- PILLOT J., DUPOUEY P. et RYTER A. La signification des formes atypiques et la notion de cycles évolutifs chez les spirochètes .

Ann. Inst. Pasteur 1964,107,484-502 et 663-677

76- PILLOT J., BETZ A., COLOMBANI J. et RIPAULT J. Le problême des réactions de fixation du complément positives avec le tréponème de Reiter en l'absence de syphilis . Rôle d'un antigène polyosidique .

Non encore publié .

77- PILLOT J. et BOREL L.J. Etude des anticorps responsables de la réaction d'immuno-fluorescence avec le système treponema pallidum, sérum de sujet atteint de tréponématose .

C.R. Acad. Sc. 1961,252,954-956

78- PILLOT J., DUPOUEY P. et FAURE P. Composition antigénique des tréponèmes .

Ann. Inst. Pasteur . Mai 1960,98,734-747
Mars 1964,106,456-468
Avril 1964,106,617-627

79- Prophylaxie antivénérienne. Février 1951.

80- PUTKONEN T. et LASSUS A. Permanence chez les membres d'une même famille de réactions biologiques faussement positives aux épreuves sérologiques de la syphilis .

WHO/VDT/RES/ 69-65

81- PUCCINELLI V.A. Pluralité des anticorps du sérum syphilitique . Importance en pratique clinique .

Sem. Hôp. Paris . (Arch. Méd. Biol.) 1953,29^b,118^b-122^b

82- REITER H.

Die Medizinische Welt (Avril 1960),14

83- RYTER A.et PILLOT J.

Ann. Inst. Pasteur 1963,104,496

84- SCHMEROLD W., DEUBNER B. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Reiter spirochaetales und Nichos-treponemen .

Hautarzt, 1954,5,511-513

85- SWAIN R.H.A. Elektron microscopic studies on the morphology of pathogenic spirochaetes .

Jl. Path. and Bact. 1955,69,117-128

86- TANI T., MATSUBARA M. et HAYASHI T. Pfeiffer's phenomenon of syphilis spirochetes and active immunisation against syphilis .

Japan Jl. Méd. Sc. Biol. 1955,8,303-311

87- VAISMAN A. et HAMELIN A.

Presse Méd.33-2 Juillet 1960, 1297-1298

88- VAISMAN A. et HAMELIN A. Nouvelle méthode de séro-diagnostic de la syphilis in vivo ou phénomène de Pfeiffer appliqué à Treponema Pallidum .

Ann. Inst. Pasteur 1959,97,420-424

89- VAISMAN A. et HAMELIN A. Application au diagnostic sérologique de la syphilis de la méthode d'immuno-fluorescence .

Presse Méd.1961,69,1157-1159

90- VAISMAN A. et HAMELIN A. La place des antigènes tréponémiques dans le diagnostic sérologique de la syphilis .

Path. Biol. 1959,7,19-20,2141-2144

91- WILKINSON A.E. et JOHNSTON N.A. Results of parallel tests with the Reiter protein fixation test, the treponemal immobilization test and the treponemal Wassermann-reaction on 1046 sera .

Brit. Jl. Ven. Dis. 1959,35,3,175-180

92- VARGUES R. Utilisation de l'auto-analyseur pour l'étude et la réalisation des réactions de fixation du complément .

Symp. intern. Technicon 1-2-3 Octobre 1964 Paris

93- VARGUES , STUDIEVIC, GONTIER, MORAUD . Effet de la température sur la vitesse de la réaction de fixation du complément .

A paraître : Ann. Inst. Pasteur .

94- VARGUES R. MORAUD B. LORTHOLANY J. Etude cinétique de l'inactivité du complément dans les réactions spécifiques et non spécifiques .

C.R. Soc. Biol. 1962,156,1895.

95- VARGUES R., AYEVA R. Utilisation de l'auto-analyseur Technicon dans l'étude cinétique de la fixation du complément immunologique .

C.R. Soc. Biol. 1963,157,872-876

EDITIONS A.G.E.M.P.
8 RUE DANTE
- PARIS V^e -
ODÉ 58-90